

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. David Krbušek

Funkční analýza diferenciálně exprimovaných miRNA v buněčných liniích HPV pozitivních a HPV negativních odvozených od nádorů různé anatomické lokalizace

Functional analysis of differentially expressed miRNAs in HPV positive and HPV negative cell lines derived various anatomical localization

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Martina Saláková, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. 08. 2022

.....

Poděkování

Rád bych poděkoval své školitelce RNDr. Martině Salákové, Ph.D. za ochotu a trpělivost při vedení a sepisování mé diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat M.Phil. Madiha Kanwal PhD. za metodickou pomoc a rady v průběhu výzkumu a celému laboratornímu týmu za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Na závěr bych rád poděkoval své rodině za podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

MikroRNA (miRNA) jsou malé nekódující RNA regulující genovou expresi. Expresní profily miRNA ukázaly řadu diferenciólně exprimovaných miRNA specifických pro nádory asociované s lidskými papilomaviry (HPV). Mezi tyto miRNA se řadí miR-139-5p, která má v těchto nádorech sníženou expresi. V diplomové práci proto byla studována role miR-139-5p v *in vitro* modelech buněčných liniích, které jsou HPV pozitivní (CRL-3240, SiHa) a HPV negativní (FaDu, C-33A). V buněčných liniích transfekovaných mimikující miRNA miR-139-5p byla sledována schopnost proliferace a migrace buněk. Buněčná proliferace byla studována pomocí MTT metody, zatímco pro hodnocení migračních schopností buněk byly využity dvě metody, metoda hojení ran a metoda transwell. Za využití databází TargetScan a miRDB byly predikovány mediátorové RNA (mRNA) cílových genů miR-139-5p. Změna exprese cílových genů, stejně jako ověření úspěšného zvýšení exprese miRNA v buněčných liniích, byla ověřena pomocí metody RT-qPCR. Zvýšení exprese miR-139-5p ve všech buněčných liniích nevedlo ke statisticky signifikantním změnám ($p \leq 0,05$) v proliferačních ani migračních schopnostech. Jako cíle mimikující miR-139-5p byly vybrány mRNA genů *FOS*, *JUN*, *KIF13A* a *GDF10*. Transfekované buněčné linie nevykazovaly výrazné snížení exprese cílových mRNA. U buněčné linie SiHa došlo po transfekci naopak ke zvýšení exprese cílové mRNA genu *FOS*.

Klíčová slova

Lidský papilomavirus, Orofaryngeální nádory, MicroRNA, Tumor supresor, miR-139-5p

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate gene expression. MiRNA expression profiles showed several differentially expressed miRNAs specific to human papillomavirus (HPV)-associated tumors. These miRNAs include miR-139-5p, which has reduced expression in these tumors. In this thesis, the role of miR-139-5p was studied *in vitro* on cell lines that were HPV positive (CRL-3240, SiHa) and HPV negative (FaDu, C-33A). Cell lines were transfected with mimic miRNA, the ability of cells to proliferate and migrate was then studied. Cell proliferation was studied using MTT assay, while Scratch wound healing assay and transwell assay were used to evaluate the migratory abilities of the cells. Mediator RNAs (mRNAs) of target genes of miR-139-5p were predicted using TargetScan and miRDB databases. The change in gene expression of target mRNAs, as well as the verification of the successful increase in miRNA expression in the cell lines, was verified using RT-qPCR. Increase of miR-139-5p expression in all used cell lines did not lead to statistically significant changes ($p \leq 0.05$) in proliferative or migratory abilities. The mRNAs of *FOS*, *JUN*, *KIF13A* and *GDF10* genes were selected as targets of miR-139-5p. Transfected cell lines did not show a noticeable reduction in the expression of the target mRNAs. On the contrary, in the SiHa cell line, the expression of *FOS* mRNA increased after transfection.

Key words

Human papillomavirus, Oropharyngeal tumors, MicroRNA, Tumor supresor, miR-139-5p

Seznam použitých zkratk

AD	adenocarcinoma	adenokarcinom
Ago 1-4	argonaut proteins 1-4	proteiny 1-4 rodiny argonaut
ANOVA	analysis of variance	analýza variance
ASR-W	age standardized rate according to world standard	věkově standardizová incidence dle světového standardu
BRD4	bromodomain-containing protein 4	protein obashující bromodoménu 4
c-Myc	celular Myc	buněčný Myc
CCK-8	cell counting kit 8	souprava na počítání buněk 8
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
Ct	cycle of threshold	cyklus prahové hodnoty
ddH ₂ O	double distilled water	dvakrát destilovaná voda
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
dsDNA	double-strand DNA	dvou-vláknová DNA
E	early	časný
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine	5-ethynyl-2'-deoxyuridin
EGFR	epidermal growth factor receptor	receptor epidermálního růstového faktoru
Ep5	exportin 5	exportin 5
EZH2	enhancer of zeste homolog 2	enhancer zeste homologu 2
FBS	fetal bovine serum	fetální bovinní sérum
FC	fold change	změna exprese
GA	golgi apparatus	golgiho aparát
HCl	hydrochloric acid	kyselina chlorovodíková
HDAC	histone deacetylase	histon deacetyláza
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma	spinoceleulární karcinom hlavy a krku
HPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	hypoxantin-guanin fosforibosyltransferáza
HPV	human papillomavirus	lidský papillomavirus
HPV ⁺	HPV positive	HPV pozitivní
HPV ⁻	HPV negative	HPV negativní
HR HPV	high risk HPV	vysoce rizikové HPV
HSPG	heparan sulfate proteoglycan receptor	heparansulfátový proteoglykanový receptor
kbp	kilobase pair	kilopár bází
L	late	pozdní
LCR	long controlling region	dlouhá kontrolní oblast
lncRNA	long non-coding RNA	dlouhá nekódující RNA
LR HPV	low risk HPV	nízce rizikové HPV
MHC1	major histocompatibility complex 1	hlavní histokompatibilní komplex 1
miRDB	micro-RNA database	databáze mikro RNA
miRNA	micro-RNA	mikro RNA
mRNA	mediator RNA	mediátorová RNA

MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid
NAD(P)H	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NGS	new generation sequencing	sekvenování nové generace
NKM	negative control mimic miRNA	negativní kontrola mimikující miRNA
oncomiR	oncological miRNA	onkologická miRNA
OSCC	oral squamous cell carcinoma	orální spinocelulární karcinom
OPSCC	oropharyngeal squamous cell carcinoma	orofaryngeální spinocelulární karcinom
p53	protein 53	protein 53
PBS	phosphate buffered saline	fosfátový pufr
pRb	retinoblastoma protein	retinoblastomový protein
pre-miRNA	precursor miRNA	prekurzorová miRNA
pri-miRNA	primary miRNA	primární miRNA
Ran-GTP	ras related nuclear protein-guanosintrifosfate	ras příbuzný jaderný protein guanosin fosfát
RISC	RNA induced silencing complex	umlčovací komplex indukovaný RNA
RNA	ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
RPA	replication protein A	replikační protein A
RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction	kvantitativní reverzně-transkripční polymerázová řetězová reakce
SDS	sodium dodecyl sulfate	dodecyl síran sodný
SSC	spinocellular carcinoma	spinocelulární karcinom
STK4	serine/threonine-protein kinase 4	serin/treonin-protein kináza 4
SWHA	scratch wound healing assay	analýza hojení ran
TCF4	transcription factor 4	transkripční faktor 4
TRBP	transactivation response element RNA-binding protein	RNA-vazebný protein transaktivačního responzivního elementu
UTR	untranslated region	nepřekládaná oblast
vDNA	viral DNA	virová DNA
WT	wild type	neošetřený vzorek

Obsah

Abstrakt	I
Seznam použitých zkratk	III
Obsah.....	V
1 Úvod	1
2 Cíle práce	2
3 Přehled literatury.....	3
3.1 Lidské papilomaviry.....	3
3.2 MicroRNA.....	10
3.3 MikroRNA a nádory.....	13
3.4 Role miR-139-5p a miR-147b.....	18
4 Materiál a metody	22
4.1 Buněčné linie.....	22
4.2 Výběr kandidátních miRNA a jejich cílových mRNA	25
4.3 Transfekce mimikující/inhibující miRNA	25
4.4 Stanovení proliferace buněk	26
4.5 Stanovení migrace buněk	28
4.6 Izolace RNA z buněčných linií.....	29
4.7 Stanovení exprese miRNA v buněčných liniích	30
4.8 Stanovení exprese cílových mRNA.....	32
4.9 Statistická analýza	34
5 Výsledky	34
5.1 Výběr kandidátních miRNA.....	34
5.2 Transfekce a ověření změn exprese miRNA v transfekovaných buněčných liniích.....	34
5.3 Ověření změn proliferace	39
5.4 Ověření změn migrace.....	42
5.5 Stanovení cílových mRNA a ověření změn jejich exprese.....	49
6 Diskuse	53
7 Závěr.....	61
8 Seznam použité literatury	62
9 Přílohy.....	71

1 Úvod

Infekce lidskými papilomaviry je jednou z příčin vzniku řady nádorů anogenitální oblasti mužů i žen a zároveň hlavní příčinou karcinomu děložního hrdla. Tato infekce také může vést ke vzniku nádorů v oblasti hlavy a krku. Právě incidence nádorů hlavy a krku, především v oblasti orofaryngu, zapříčiněné touto infekcí jsou v rozvinutých zemích na vzestupu. Na druhou stranu dochází k poklesu incidence nádorů, které jsou způsobeny tradičními rizikovými faktory jako je kouření a konzumace alkoholu (Lechner et al., 2022). Včasná diagnostika zlepšuje prognózu onemocnění, vyžaduje ale spolehlivé specifické diagnostické znaky.

MikroRNA jsou krátké nekódující RNA, které byly objeveny v roce 1993, a hrají důležitou roli v regulaci genové exprese. U člověka se účastní regulace asi 60 % protein-kódujících genů. Změna exprese miRNA je u nádorových onemocnění častá a může přispívat k progresi onemocnění. Znalost přesné funkce miRNA je velmi důležitá pro pochopení mechanismů, které se podílejí na vzniku nádorů. Lidské papilomaviry prostřednictvím svých proteinů E5, E6 a E7 mohou ovlivňovat expresi celé škály miRNA v infikovaných lidských buňkách, a proto by mohly být specifickým diagnostickým znakem pro včasné zjištění přítomnosti nádorů, jejichž příčinou je infekce lidskými papilomaviry.

Laboratoř molekulární a nádorové virologie se již delší dobu zabývá studiem expresních profilů miRNA u nádorů hlavy a krku ve vztahu k etiologii onemocnění a prognóze, s cílem vybrat takové miRNA, které by mohly být diagnostickými znaky. Pro použití miRNA jako diagnostických znaků je třeba znát míru exprese, ale pro jejich terapeutické využití je třeba znát i jejich funkci. Ve studii Nunvář a kol. na kterou tato diplomová práce navazuje, bylo cílem zjistit, zda existuje miRNA profil společný pro nádory pozitivní na HPV v různých anatomických lokalizacích (Nunvar et al., 2021). Tato diplomová práce se v návaznosti zaměřuje na zjištění funkce vybraných diferencially exprimovaných miRNA v nádorech hlavy a krku.

2 Cíle práce

Cílem práce je zjistit funkci vybraných diferencíálně exprimovaných miRNA v buněčných liniích HPV pozitivních a HPV negativních odvozených od nádorů hlavy a krku a karcinomu hrdla děložního.

Základní hypotéza je: Změna exprese diferencíálně exprimovaných miRNA u nádorů orofaryngu a cervixu asociovaných s lidskými papilomaviry vede ke změnám v proliferaci a migraci nádorových buněk.

Dílčí cíle jsou:

1. Predikce cílových mRNA miR-139-5p a miR-147b-5p pomocí databáze miRDB a TargetScan v.7.2.
2. Sledování změn proliferace a migrace daných buněčných linií po transfekci mimikující miRNA-139-5p
3. Ověření změny exprese vybraných cílových genů po transfekci mimikující microRNA

3 Přehled literatury

3.1 Lidské papilomaviry

3.1.1 Lidské papilomaviry a jejich klasifikace

Lidské papilomaviry (HPV) patří do čeledi *Papillomaviridae* a dále se řadí do pěti rodů a to Alphapapillomavirus, Betapapillomavirus, Gammapapillomavirus, Mupapillomavirus a Nupapillomavirus. Tato čeleď se skládá z neobalených virů s kruhovým dvouvláknovým DNA (dsDNA) genomem o délce přibližně 8 tisíc párů bází (kbp) (Chouhy et al., 2013). Kapsida HPV je ikosaedrického tvaru, má průměr ~ 55 nm a symetrii $T = 7$. Je složená z 360 kopií hlavního kapsidového proteinu L1, které jsou sestaveny do 72 pentamerů. Kapsidový protein L2 je též součástí kapsidy, ale až na dva aminokyselinové zbytky je přítomen na jejím vnitřním povrchu (Keiffer et al., 2021). Klasifikace papilomavirů je založena na párové identitě nukleotidové sekvence v otevřeném čtecím rámci L1. Členové čeledi *Papillomaviridae* primárně infikují sliznice a kůži a mohou kromě člověka infikovat i ostatní obratlovce, přičemž infekce je druhově i tkáňově specifická (de Villiers et al., 2004).

Papilomaviry, obecně, způsobují především benigní nádory jako jsou bradavice a papilomy, avšak mohou být i příčinou vzniku malignit v anogenitální oblasti, oblasti hlavy a krku a kožních malignit. Infekce některými typy papilomavirů, u lidí například typy HPV16 a HPV18, může vést k maligní transformaci infikovaných buněk (de Villiers et al., 2004). Lidských papilomavirů je dnes známo přes 400 typů dle databáze PaVE (https://pave.niaid.nih.gov/explore/reference_genomes/human_genomes). Současný systém pro klasifikaci HPV je, jak již bylo řečeno, založen na podobnostech v genomových sekvencích L1, kdy nový typ HPV je ten, jenž má méně než 90 % sekvenční podobnost v L1 genu s jakýmkoli jiným typem HPV (de Villiers et al., 2004). Jednotlivé typy se též dají rozdělit podle tkáňového tropismu na typy slizniční (např. HPV 6, 11, 16, 18, 33) a kožní (např. HPV 1, 2, 4, 27, 57, 5, 8) (Ljubojevic & Skerlev, 2014). Slizniční lidské papilomaviry se též rozlišují na vysoce a nízké rizikové, tedy HR a LR HPV, a to na základě nádorového potenciálu. Jako HR HPV jsou označovány typy -16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82; typy -26, 53, 66 jsou pravděpodobně HR HPV a LR HPV jsou typy -6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 a 89. HR HPV jsou spojovány se spinocelulárním karcinomy, zatímco LR HPV s benigními bradavicemi (Muñoz et al., 2003).

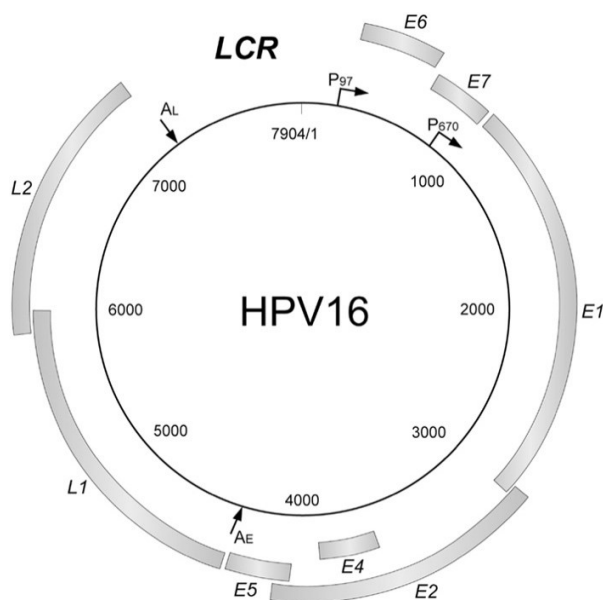
HR HPV způsobují karcinom děložního hrdla v téměř 100 % případů a jsou též příčinou dalších nádorů jako karcinomu vulvy, vaginy, penisu, konečníku či nádorů hlavy a krku. Infekce HPV je nejčastější sexuálně přenosnou virovou infekcí. Většina sexuálně aktivních žen

a mužů se během svého života infikuje a někteří mohou být infikováni opakovaně, přičemž většina infikovaných infekci vyčistí do dvou let a jen u méně než 1 % jedinců se vyvine onemocnění (CDC, n.d.; WHO, n.d.).

V roce 1976 stanovil Harald zur Hausen jako první hypotézu, že je HPV infekce spojená s karcinomem děložního čípku (zur Hausen, 1976), v roce 2008 mu byla v této souvislosti udělena Nobelova cena.

3.1.2 Organizace genomu a proteiny HPV

Většina papilomavirů kóduje osm hlavních proteinů, viz obrázek 1, potřebných nejen k replikaci a maturaci viru, ale také k ovlivnění buněčného cyklu, buněčné signalizace, a dalším modifikacím hostitelské buňky. Tyto proteiny jsou kódované ve dvou oblastech virového genomu, a to v takzvané časně (early; E) a pozdní (late; L) oblasti. Oblast E kóduje nestrukturní proteiny E1, E2, E4, E5, E6, E7 a oblast L kóduje proteiny L1 a L2, které tvoří virovou kapsidu. Většina nestrukturních proteinů je exprimovaná v časně fázi životního cyklu viru, protein E4 je však exprimován až v pozdní fázi infekce a předchází expresi proteinů L1 a L2 (Graham, 2010). Genom dále obsahuje dlouhou kontrolní oblast (LCR) obsahující replikační počátek. Součástí genomu jsou také časně a pozdní promotory a polyadenylační signály (Kajitani et al., 2012). Jednotlivé proteiny a jejich funkce v hostitelské buňce jsou shrnuty v tabulce 1.



Obrázek 1: Organizace kruhového dsDNA genomu HPV, konkrétně HPV16. Geny jsou transkribovány ve směru hodinových ručiček. Geny kódující nestrukturní proteiny jsou označeny E, strukturní proteiny L a dlouhá kontrolní oblast LCR. Hlavní promotory a polyadenylační signály jsou vyznačeny jako P₉₇, P₆₇₀, A_E, A_L (Kajitani et al., 2012).

Protein	Funkce v životním cyklu
E1	Replikace genomu – ATP-dependentní DNA helikáza
E2	Replikace genomu – rozpoznání ori, transkripce, enkapsidace, regulace exprese buněčných genů, regulace apoptózy
E4	Remodelace cytotokeratinové sítě, zastavení buněčného cyklu, sestavení virionu
E5	Kontrola buněčného růstu a diferenciaci, imunitní modulace
E6	Ovlivnění buněčného cyklu, inhibice apoptózy, imortalizace buněk, proliferace
E7	Ovlivnění buněčného cyklu, inhibice apoptózy, imortalizace buněk, proliferace
L1	Hlavní kapsidový protein
L2	Minoritní kapsidový protein, účastní se sestavení viru

Tabulka 1: Přehled proteinů kódovaných lidskými papilomaviry a jejich funkce v rámci replikačního cyklu (Graham, 2010; Kajitani et al., 2012). Přehledný seznam buněčných cílů těchto proteinů vytvořili ve svém přehledovém článku Kajitani a kolektiv.

3.1.3 Životní cyklus

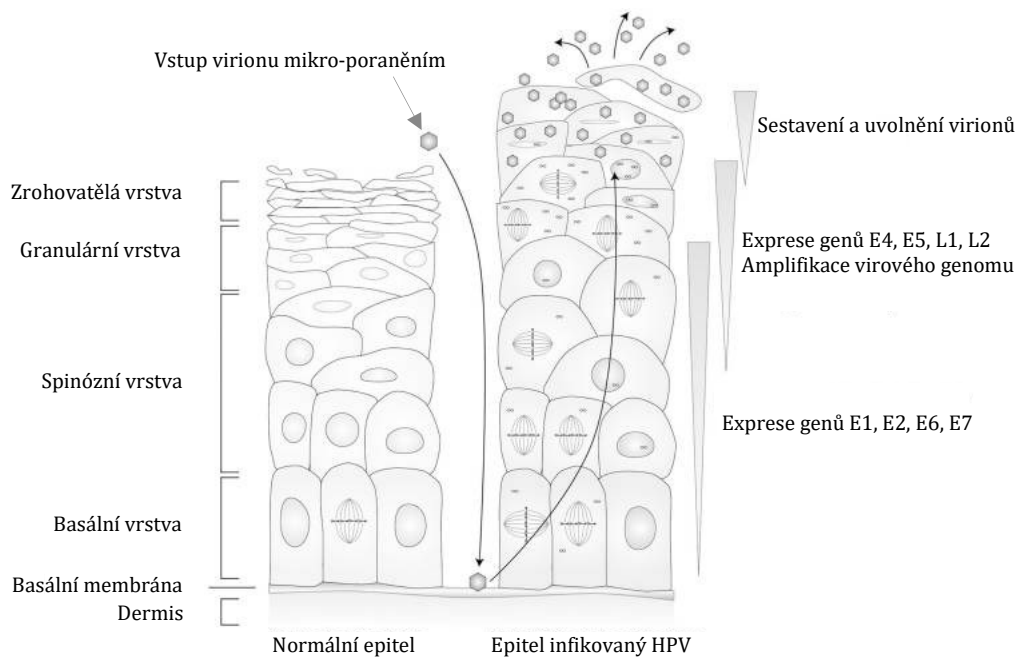
HPV infikují epitelální tkáň mikro-poškozeními nebo jiným epitelálním traumatem, který odhaluje segmenty bazální membrány. Pro transport a vstup do bazálních buněk je nejprve nutná vazba k heparansulfátovému proteoglykanovému receptoru (HSPG) extracelulární matrix prostřednictvím hlavního kapsidového proteinu L1. Tato vazba je následována proteolytickým štěpením L1 proteinu serinovou proteázou kallikrein-8 (Cerqueira et al., 2015). Následná změna konformace L1 proteinu pomocí buněčných enzymů vede k odhalení N-konce kapsidového proteinu L2, který obsahuje konzervované štěpné místo pro furin (Kines et al., 2009). Štěpení L1 a L2 proteinů má za následek konformační změny těchto proteinů, které vedou ke snížení afinity k HSPG receptoru. Virion je transportován podél filopodií k bazálním buňkám, které jsou následně infikovány. Viriony pro vstup do bazálních buněk využívají způsob nezávislý na HSPG, ale receptor zodpovědný za vstup virionů do buněk je zatím neznámý. Receptory, u kterých se předpokládá, že by mohly být důležité pro vstup, jsou $\alpha 6$ a $\beta 4$ integríny, annexin A2, receptor epidermálního růstového faktoru, CD9, CD63 a CD151. Po vazbě k receptoru na povrchu bazálních buněk dojde k internalizaci viru a vzniku endozomu (Keiffer et al., 2021). Z pozdního endozomu virus uniká díky konformačním změnám kapsidových proteinů a odhalení L2 proteinu. Konformační změna je umožněna díky acidifikaci endozomu (Müller et al., 2014). Strukturální protein L2 penetruje membránu endozomu, což v konečném důsledku vede k proniknutí HPV do cytoplazmy (Kämper et al., 2006).

V cytoplazmě je genom HPV chráněn membránovou strukturou, která je odvozena z endozomu. Tato struktura je díky L2 proteinu schopná interagovat s vnitrobuněčným transportním systémem, a je tak dopravena do lumen Golgiho aparátu (GA). Tento způsob přepravy v rámci

buňky též znesnadňuje rozpoznání virové DNA (vDNA) v cytoplazmě a aktivaci vnitrobuněčných signálních drah jako je cGAS/STING. Komplex L2/vDNA není schopen proniknout do jádra a přetrvává v lumen GA až do G2/M fáze buněčného cyklu. Potom co dojde k rozpadu jaderného obalu, se tento komplex pohybuje podél vřetenkových mikrotubulů, aby se později stal součástí nově vznikajícího jádra. Vezikuly obsahující komplex L2/vDNA zůstávají neporušené až do tvorby nového jaderného obalu (Uhlorn et al., 2020).

Po vniknutí vDNA do nově vzniklých jader bazálních buněk přetrvává vDNA ve formě episomů. V jádře se aktivuje časný promotor (P₉₇), což vede k expresi časných genů, jejichž proteinové produkty jsou potřebné pro replikaci genomu (Mac & Moody, 2020). Časný protein E1 je virová ATP – dependentní helikáza, která spolu s E2 proteinem nasedá do místa počátku replikace a rozvolní zde DNA (Yang et al., 1993). Vzniká tak místo pro tvorbu replikačních vidliček, které jsou tvořeny buněčnými replikačními faktory (Kuo et al., 1994). To vede k rychlé amplifikaci virových episomů za vzniku 50–100 kopií na buňku. V nediferencovaných buňkách jsou virové genomy udržovány na nízkém počtu kopií a replikují se spolu s buněčnou DNA. Jak se infikované bazální buňky dělí a migrují z bazální vrstvy epitelu, dochází k jejich diferenciaci. Transkripční faktory, které hostitelská buňka poskytuje během diferenciaci epitelu, indukují produktivní fázi životního cyklu viru, což vede k aktivaci pozdního promotoru (P₆₇₀) a expresi pozdních virových genů (E4, E5, L1, L2), stejně jako k vysokým hladinám E1 a E2, které řídí amplifikaci vDNA za vzniku tisíců kopií na buňku. Tvorba a uvolnění nových virových partikulí je omezeno na nejvyšší vrstvy epitelu (Mac & Moody, 2020). Životní cyklus HPV, včetně grafického znázornění postupné exprimace virových genů v závislosti na stupni diferenciaci hostitelských buněk, shrnuje obrázek 2 (Kajitani et al., 2012).

Infikované diferencované epiteliální buňky si zachovávají aktivní buněčný cyklus. Je tomu tak především díky virovým proteinům E6 a E7, které deregulují kontrolní body buněčného cyklu. Aktivní buněčný cyklus poskytuje viru buněčné faktory nezbytné pro produktivní virovou replikaci (Longworth et al., 2005; Munger et al., 1989; Scheffner et al., 1990).



Obrázek 2: Grafické znázornění postupné exprese virových genů v závislosti na stupni diferenciaci hostitelských buněk po infekci buněk bazální membrány virem HPV. Obrázek převzat a upraven dle Kajitani et al., 2012.

3.1.4 Karcinogeneze HPV

Dle definice je karcinogeneze proces změn, které (vlivem karcinogenů) vedou k přeměně „normální“ buňky na buňku nádorovou. Jde buď o změny genetické informace (mutace genů), nebo o poruchu regulačních mechanismů (Karcinogeneze »Linkos.cz, n.d.). Charakteristickými znaky lidských rakovinných buněk je získání osmi biologických schopností v průběhu vývoje nádoru. Mezi těchto osm získaných biologických schopností se řadí: udržení růstových signálů, necitlivost k inhibitorům buněčného růstu, odolnost proti buněčné smrti, neomezený replikační potenciál, aktivace invazivity buněk a tvorba metastáz, indukce angiogeneze, přeprogramování buněčného metabolismu a vyhnutí se destrukci imunitního systému (Hanahan, 2022).

Replikace HPV je závislá na dělicích se buňkách hostitele. Proteinové produkty virem kódovaných genů E6, E7 a E2, hrají klíčovou roli v životním cyklu viru, neboť svými účinky ovlivňují proliferaci buněk. Protein E6 u HR i LR HPV blokuje transkripční aktivitu p53 tím, že inhibuje koaktivátor transkripce p300 (Thomas & Chiang, 2005). Protein E6 u HR HPV se navíc váže na buněčný tumor supresorový protein p53 a tvoří komplex s buněčnou ubikvitin ligázou E6AP, čímž směřuje p53 k degradaci (Huibregtse et al., 1991; Scheffner et al., 1990). Takto působí pouze protein E6 HR HPV. Tento protein u HR HPV váže stejně jako u LR HPV C-koncovou doménu proteinu p53, u HR HPV však navíc váže také centrální doménu proteinu p53. Právě vazba E6 HR HPV do centrální domény p53 je důležitá pro jeho degradaci (X. Li & Coffino, 1996). Protein p53 se účastní různých buněčných procesů, včetně regulace buněčného

cyklu, apoptózy, stárnutí, oprav DNA, buněčné diferenciaci a angiogeneze. Umlčení p53 pomocí virových proteinů či mutace v tomto proteinu vedou k neschopnosti plnění jeho funkcí, především k neschopnosti aktivovat buněčnou smrt (Vogt Sionov & Haupt, 1999).

Protein E7 se váže na člena retinoblastomové tumor supresorové rodiny (pRb) (Dyson et al., 1989). Tato vazba má za následek uvolnění E2F z pRB, a tedy progresi buněčného cyklu z G1 do S fáze (Giarrè et al., 2001). Protein pRB hraje klíčovou roli při replikaci DNA, opravě DNA, prevenci apoptózy, diferenciaci a stárnutí buněk. Protein E7 u HR HPV váže pRb s vyšší afinitou (asi 10krát silněji) než E7 u LR HPV (Munger et al., 1989) Retinoblastomový protein ve své hypofosforylované formě blokuje přechod mezi fázemi G1/S v rámci buněčného cyklu vazbou transkripčního faktoru E2F a potlačením transkripce cílových genů E2F. Pro přechod směrem do S fázi musí být pRB fosforylován komplexy cyklinu D a cyklin dependentní kinázy CDK4/6. Protein E7 potlačuje tuto normální kontrolu buněčného cyklu vazbou na pRb, čímž zabraňuje vazbě pRb s E2F, což vede k uvolnění proteinu E2F a transkripci cílových genů tohoto transkripčního faktoru (Dyson et al., 1989). Protein E7 u HR HPV, na rozdíl od LR HPV, indukuje degradaci pRb proteazomem (Giarrè et al., 2001).

Za normálních okolností virový protein E2 reguluje E6 a E7 na genové i proteinové úrovni, čímž nepřímo ovlivňuje buněčnou proliferaci. Bez správné funkce genu E2 dochází k deregulaci exprese proteinů E6 a E7, které mají imortalizační a transformační vlastnosti, což vede k tomu, že buňky získají schopnost nepřetržitě proliferace (McBride, 2013).

Většina HPV infekcí je odstraněna imunitním systémem, ale v některých případech infekce přetrvává. Po infekci může virus zůstat ve své epizomální formě nebo se integrovat do hostitelského genomu. Obě tyto formy mohou vést k indukci tumorigeneze (Kamal et al., 2021). U HPV-indukovaných nádorů vede náhodná integrace virového genomu do hostitelského genomu často k narušení genu E2 a ztrátě exprese E2. Inaktivace genu E2 v rámci integrace do genomu hostitele je důležitý krok vedoucí k tumorigenezi indukované HPV. Tato integrace však vede ke snížení tvorby nových virů (Mkrтчian et al., 2021). Pokud se virus neintegruje a zůstává v epizomální formě, může dojít také k indukci tumorigeneze díky tomu, že exprese genů E6 a E7 není zcela inhibována a dochází k „prokluzování“ exprese (*leaky expression*) těchto genů. U HPV-asociovaných nádorů je přítomnost epizomální formy HPV méně častá než formy integrované (Kamal et al., 2021).

Aberantní exprese virových proteinů E6 a E7, je nutná pro indukci vzniku nádorů, vede ke zvýšené proliferaci a snížené apoptóze infikovaných buněk, což vede k jejich imortalizaci. V takto imortalizovaných buňkách dochází k nahromadění poškození a mutací v hostitelské

DNA. Právě tyto poškození a mutace jsou nutné k progresi nádorového onemocnění (Moody & Laimins, 2010).

3.1.5 Nádory hlavy a krku

Nádory hlavy a krku jsou skupinou heterogenních nádorů. Hlavním rizikovým faktorem je konzumace alkoholu a tabákových výrobků. Mezi další faktory vzniku těchto nádorů patří: vystavení ultrafialovému záření (slunce, solária), expozice karcinogenům v zaměstnání (např. formaldehyd, azbest, dřevěný prach), infekce virem Epstein-Barrové a radiační léčba. Infekce HPV je významným rizikovým faktorem vzniku nádorů především v oblasti orofaryngu. Na základě studie CDC vyplývá, že 70 % nádorů orofaryngu je kauzálně spojeno s infekcí HPV (CDC, 2021; Viens et al., 2019).

Spinocelulární karcinomy hlavy a krku (HNSCC) byly historicky spojeny hlavně s konzumací alkoholu a tabáku. Snížení prevalence kouření ve většině vyspělých zemí v souvislosti s protikuřáckými opatřeními za posledních 20 let vedlo k poklesu incidence HNSCC. Sledování etiologie HNSCC ukázalo, že infekce HPV je rizikový faktor, který ve stejném období naopak zaznamenal nárůst ve výskytu HNSCC, konkrétně ve výskytu orofaryngálního spinocelulární karcinomu (OPSCC) (Lechner et al., 2022). OPSCC zahrnuje karcinomy tonzil, spodiny jazyka, měkkého patra a uvuly. Výskyt HPV pozitivních (HPV⁺) OPSCC se však geograficky liší. Metaanalýza provedená na studiích probíhajících mezi lety 2015 a 2021 ukázala, že v zemích jako je Indie či Španělsko dosahoval výskyt HPV⁺ OPSCC 0 % a 10 %, zatímco v jiných zemích jako USA či Švédsko dosáhl 68 % a 70 %. Za většinou případů HPV⁺ OPSCC stála infekce HPV16, avšak typy HPV18, HPV33 a HPV35 jsou též často detekovány v těchto malignitách (Carlander et al., 2021). Hlavním rizikovým faktorem spojeným s HPV⁺ HNSCC je sexuální chování. Byla pozorována souvislost mezi počtem partnerů provozujících orální sex a výskytem onemocnění (D'Souza et al., 2016).

V roce 2020 bylo v České republice 364 nových případů tonzilárního karcinomu. Incidence měla k roku 2020 hodnotu 2,2 dle standardu ASR-W (věkově standardizovaná incidence dle světového standardu) a nejpostiženější věková skupina byla 60–64 let. U mužů je incidence dlouhodobě vyšší než u žen, v roce 2020 byla incidence tonzilárního karcinomu u mužů 6 případů na 100 000 obyvatel, zatímco u žen ve stejném období to byly 2 případy na 100 000 obyvatel (<https://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#>). Pacienti s HPV⁺ orofaryngálními nádory jsou celkově mladší, vykazují lepší celkové přežití a reagují lépe na léčbu než pacienti s HPV⁻ nádory stejné lokalizace (O'Sullivan et al., 2016). V České republice byla zjištěna HPV pozitivita u 65 % pacientů s tonzilárním karcinomem (Rotnáglová et al., 2011), u pacientů

s orofaryngeálními nádory a nádory hlavy a krku byla HPV infekce přítomná v 59,2 % (Koslabova et al., 2013).

3.2 MicroRNA

MicroRNA (miRNA) jsou malé endogenní jednovláknové nekódující molekuly RNA o délce přibližně 22 nukleotidů. Tyto RNA se uplatňují při post-transkripční regulaci genové exprese a můžeme je nalézt v rostlinách, zvířatech, a i u některých virů. MicroRNA fungují na základě párování bází s komplementárními sekvencemi v molekulách mediátorové RNA (mRNA). Tato komplementarita může být úplná či pouze částečná (Fabian et al., 2010). Poprvé byly miRNA popsány Leem a jeho kolegy v roce 1993 (R. C. Lee et al., 1993).

Hlavní funkcí miRNA u lidí je regulovat genovou expresi především pomocí mechanismu translační represe. Pro tento mechanismus není třeba rozsáhlého párování mezi miRNA a 3' nepřekládanou (UTR) oblastí cílové mRNA. Je zde však třeba adaptorových proteinů, které interagují jak s miRNA, tak i s cílovou mRNA. Interakce mRNA s miRNA adaptorovými proteiny vede k destabilizaci 3' poly(A) konce mRNA, rekrutaci proteinů dekapitovacího komplexu a k odštěpení 7-methylguanositové čepičky na 5' konci mRNA. Ztráta čepičky je následovaná 5'–3' exonukleolytickým štěpením mRNA (Bartel, 2018). Předpokládá se, že miRNA u lidí ovlivňují asi 60 % genů kódujících proteiny (Kumar & Reddy, 2016).

MicroRNA se vyskytují nejen v buňkách, ale i jako extracelulární cirkulující miRNA. Právě proto, že jsou uvolňovány do tělních tekutin včetně krve a mozkomíšního moku a jsou vysoce stabilní i za nefyziologických podmínek jsou zkoumány jako biomarkery u řady onemocnění (Filipów & Łaczmański, 2019).

3.2.1 Biogeneze miRNA

Geny miRNA se nacházejí buď v intronech a exonech primárních transkriptů genů kódujících proteiny a zde jsou přepisovány RNA pol. II, nebo v nezávislých nekódujících lokusech a jsou přepisovány RNA pol. III (Bartel, 2018). Biogeneze miRNA probíhá buď kanonickou nebo nekanonickou dráhou, přičemž kanonická dráha biogeneze miRNA dává vzniknout většině miRNA, a proto bude detailněji popsána dále (Kim & Kim, 2007).

V kanonické dráze biogeneze jsou miRNA transkribovány ze svých genů RNA polymerázou II jako „velké“ prekurzory RNA, které jsou několik stovek nukleotidů dlouhé. Tyto vzniklé transkripty se označují jako primární miRNA (pri-miRNA) transkripty a obsahují 5'

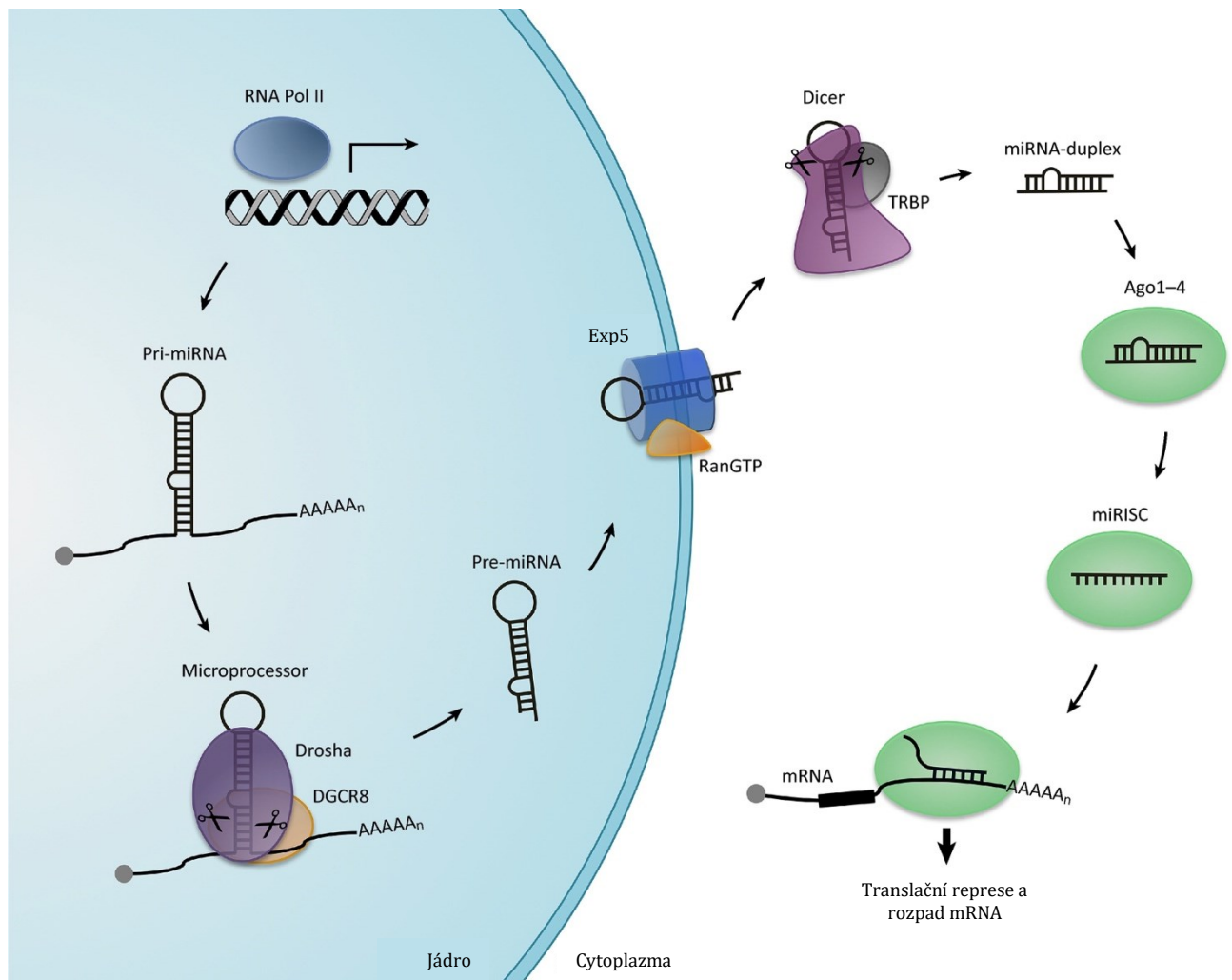
čepičku a poly-A konec (Y. Lee et al., 2004). Pri-miRNA jsou dále v jádře zpracovány na prekurzorovou miRNA (pre-miRNA) mikroprocesorovým komplexem. Ten se skládá z proteinu vázajícího dvouvláknovou RNA Pasha/DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) a enzymu ribonukleázy III (Drosha) (Denli et al., 2004). Součástí mikroprocesorového komplexu Pasha/DGCR8 rozpoznává N⁶-metyladenylované specifické motivy v pri-miRNA, zatímco Drosha štěpí duplex pri-miRNA na bázi charakteristické vlásenkové struktury pri-miRNA. To má za následek vytvoření pre-miRNA s dvounukleotidovým přesahem na 3' konci (Alarcón et al., 2015).

Vzniklé pre-miRNA mají délku ~ 70 nukleotidů a jsou poskládány do nedokonalých vlásenkových struktur. Pre-miRNA jsou pak exportovány do cytoplazmy pomocí exportinu 5 (Exp5) a komplexu Ran-GTP (ras related nuclear protein-guanosintrifosfate) (R. Yi et al., 2003). V cytoplazmě pre-miRNA podstupují další krok zpracování, a to pomocí enzymu Dicer, což je RNáza typu III (Bernstein et al., 2001). Rozeznání pre-miRNA se účastní protein TRBP (transactivation response element RNA-binding protein), který mezi velkým množstvím buněčných RNA pomáhá RNáze Dicer efektivně najít a štěpit pre-miRNA (Fareh et al., 2016). Zpracování Dicerem zahrnuje odštěpení vlásenkové smyčky v pre-miRNA a generuje miRNA duplex, dvouvláknovou RNA o délce přibližně 22 nukleotidů (Denli et al., 2004).

MikroRNA vytvořená Dicerem obsahuje dvě vlákna a jejich směr určuje název zralé formy miRNA. Vláknko 5p pochází z 5' konce pre-miRNA vlásenky, zatímco 3p vláknko pochází z 3' konce. I když obě vlákna odvozené ze vzniklého miRNA duplexu mohou být integrována do RISC komplexu (umlčovací komplex indukovaný RNA), vybráno je vždy jedno a výběr 5p nebo 3p vlákna je založen na termodynamické stabilitě na 5' koncích miRNA duplexu. Za výběr tzv. guide vlákna (vodícího vlákna), tedy vlákna inkorporovaného do RISC, jsou také částečně zodpovědné proteiny Argonaut (Ago1–4). Ty jsou též zodpovědné za zničení tzv. passenger vlákna, tedy vlákna neinkorporovaného do RISC, které je degradováno jako substrát komplexu RISC. RISC je ribonukleoproteinový komplex obsahující členy rodiny proteinů Argonaut. Argonaut proteiny mají endonukleázovou aktivitu namířenou proti řetězcům mRNA, které jsou komplementární k miRNA, jež se na mRNA váže (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003; Yoda et al., 2009). Takto vzniklá maturovaná miRNA v komplexu s RISC může modulovat genovou expresi na post-transkripční úrovni. Grafické znázornění procesu biogeneze miRNA je na obrázku 3.

Kromě této kanonické dráhy biogeneze miRNA, jak již bylo řečeno, existují i nekanonické dráhy. Tyto dráhy využívají různé kombinace proteinů zapojených do kanonické dráhy, zejména Drosha, Dicer, exportin 5 a Ago2. Obecně platí, že nekanonická miRNA biogeneze

může být seskupena do drah nezávislých na Drosha/DGCR8, nezávislých na Dicer a jejich různých kombinací (Daugaard & Hansen, 2017) .



Obrázek 3: miRNA jsou transkribovány RNA polymerázou II jako pri-miRNA a jsou zpracovány na ~70 nt pre-miRNA mikroprocesorovým komplexem složeným z enzymu RNazy III, Drosha, a proteinu vázajícího RNA, DGCR8/Pasha. Pre-miRNA vlásenky jsou poté exportovány do cytoplazmy pomocí Exp5 a RanGTP, kde jsou dále zpracovávány enzymem RNazy III, Dicer, ten odštěpí smyčku vlásenky, čímž vzniká miRNA duplex. Duplex miRNA se rozvine a vodící vlákno je navázáno na proteiny Argonaut (Ago1–4) a včleněno do komplexu RISC. Komplex miRNA-RISC využívá miRNA k navedení komplexu k mRNA a s částečnou komplementaritou sekvencí indukuje rozpad mRNA nebo translační represe. Obrázek převzat a upraven dle Daugaard & Hansen, 2017.

3.2.2 Klasifikace miRNA

MicroRNA se označují předponou „miR“, po které následuje pomlčka a číslo. Číslo je dáno pořadím při pojmenování, např. miR-1 byla objevena a pojmenována před miR-139. Identifikační čísla jsou tedy přidělována postupně, přičemž identické miRNA mají stejné číslo, bez ohledu na organismus. Označení „miR“ se vztahuje na zralou formu miRNA, zatímco označení „mir“ se vztahuje na pre- či pri-miRNA. Geny, které kódují miRNA, jsou také pojmenovány pomocí stejné třípísmenné předpony s velkými písmeny (Ambros et al., 2003).

Klasifikace využívá k označení druhu zkrácené 3 nebo 4 písmenné předpony, takže identifikátory mají tvar např. hsa-miR-101 (u *Homo sapiens*) nebo dme-miR-281-1 (u *Drosophila melanogaster*). Identickým nebo velmi podobným sekvencím miRNA v rámci druhu lze také přiřadit stejné číslo, přičemž jejich geny jsou odlišeny písmennými nebo číselnými příponami, např. transkripty ~22 nt dme-mir-13a a dme-mir-13b se mírně liší v nukleotidové sekvenci, zatímco prekurzorové miRNA dme-mir-281-1 a dme-mir-281-2 vedou k identické zralé miRNA, ale pocházejí z genů umístěných v různých oblastech genomu (Ambros et al., 2003; Griffiths-Jones et al., 2006).

3.3 MikroRNA a nádory

Nádorové buňky často vykazují aberantní expresi miRNA. Aberantní exprese miRNA v nádorových buňkách, ve srovnání s normálními buňkami, je připisována změnám v počtu kopií genů pro miRNA, změnám v regulaci exprese genů miRNA a jednonukleotidovým mutacím jak v genech pro miRNA, tak i v jejich cílových genech (Y. Peng & Croce, 2016).

Role miRNA v patogenezi nádorů může být však různá, protože miRNA mohou mít jednak tumor-supresorový, ale i onkogenní potenciál. V případě, že miRNA fungují jako tumor supresivní, může zvýšení exprese vést k zastavení kancerogeneze. U onkogeních miRNA (oncomiR) může jejich aberantní exprese ve formě zvýšené exprese vést k aktivaci maligního procesu (Kunej et al., 2012). Příkladem oncomiR je miR-125b-1 u akutní lymfoblastické leukemie, kde zvyšuje její maligní potenciál. Tato miRNA má zvýšenou expresi díky translokaci genu pro pri-miRNA do lokusu pro těžký imunoglobulinový řetězec (Sonoki et al., 2005). Mechanismy působení miR-125b-1 jsou shrnuty v přehledovém článku B. Peng et al., 2021. Oproti tomu je miR-584-5p u nemalobuněčného karcinomu plic příkladem tumor-supresorové miRNA (S. B. Lee et al., 2021). V těchto nádorech je její exprese snížena a její zvýšená exprese snižuje schopnost buněk proliferovat a migrovat. Jako cíl této miRNA byla identifikována mRNA genu

YKT6, který kóduje SNARE protein účastní se vezikulárního transportu (S. B. Lee et al., 2021).

Různé typy nádorů jsou spojovány s různou aberantní expresí miRNA, a proto je snaha zmapovat expresní profily miRNA různých typů nádorů. Expres miRNA se liší podle anatomické lokalizace, tedy záleží na typu tkáně a jejím nádorovém charakteru. Expresní profily mohou být využity pro určení potenciálních terapeutických cílů nebo jako diagnostické a prognostické markery (Tomaszewska et al., 2021). U miRNA, které mají být použity pro diagnostiku nebo terapii, je nejen potřeba zjistit, zda mají onkogenní nebo tumor-supresivní roli, ale také mechanismus, jak jejich deregulace ovlivňuje progresi nádoru. Mnoho výzkumných týmů se zabývá problematikou expresního profilu exprese miRNA související s různými typy nádorů např. nádory prsu, plic, prostaty, pankreatu (Bauer et al., 2012; Blenkiron et al., 2007; Porkka et al., 2007; Yanaihara et al., 2006). Již byly identifikovány miRNA, které slouží jako diagnostické markery při diagnostice karcinomu pankreatu (Bonneau et al., 2019).

3.3.1 Expresní profil miRNA v HPV⁺ nádorech

Expresní profily HPV⁺ nádorů byly studovány jak na buněčných liniích, tak na klinických vzorcích získaných od pacientů a v tom případě by měly být porovnávány se vzorky zdravé tkáně stejné anatomické lokalizace.

V roce 2012 Lajer a kol. definovali skupinu "HPV core" miRNA specifických pro dva typy HPV⁺ nádorů, a to karcinomu hrdla děložního a tonzil. Tzv. "HPV core" je skupina miRNA, jejichž deregulace je specifická a závislá na infekci HPV. "HPV core" bylo stanoveno pomocí expresních profilů z klinických vzorků nádorů a zdravé tkáně pomocí analýzy exprese za využití mikročipů (*mikroarray*). Expresní profily byly mezi sebou porovnány a byly vybrány ty miRNA, které vykazovaly signifikantní změnu exprese specifickou pro HPV⁺ vzorky. Takových miRNA bylo celkem 36, z nich 22 mělo zvýšenou expresi a 14 sníženou (Lajer et al., 2012).

Vojtěchová a kol. se zaměřili na studium expresního profilu HPV⁺ HNSCC, konkrétně na tonsilární nádory. Na vzorcích nádorové tkáně od pacientů definovali 46 miRNA se zvýšenou a 31 miRNA se sníženou diferenciální expresí miRNA charakteristických pro HPV⁺ nádory tonzil, 42 miRNA se zvýšenou a 42 miRNA se sníženou diferenciální expresí miRNA charakteristických pro nádory nezávislé na HPV infekci. Expresní profil vzorků od pacientů byl porovnáván oproti vzorkům zdravé tkáně ze stejné lokalizace. Při srovnání získaných expresních profilů s expresními profily u cervikálních nádorů určily miR-141-3p, miR-15b-5p, miR-200a-3p, miR-302c-3p a miR-9-5p jako specifické miRNA pro HPV indukované malignity.

MiR-335-5p, miR-579-3p a miR-126-5p byly sdíleny expresními profily HPV⁺ tonzilárních nádorů a HPV imortalizovaných keratinocytových klonů. Studie pro porovnání expresních profilů miRNA v klinických vzorcích využila metodu TaqMan Low Density Arrays, což je jiná metoda, než použila skupina Lajera a kol. (Vojtechova et al., 2016).

Další studie zaměřená na zjištění expresního profilu miRNA u HPV⁺ HNSCC využila analýzy 61 čerstvě odebraných primárních orálních (OSCC) a orofaryngeálních vzorků od pacientů se spinocelulárním karcinomem. HPV DNA a RNA byla nalezena ve 21 % případů. MiRNA profilování pomocí sekvenování nové generace bylo provedeno na 22 vzorcích a odhalilo 7 specifických miRNA pro HPV⁺ OSCC, 77 pro HPV⁺ OPSCC a další 3 sdílené oběma. Expresní profily nádorových tkání byly porovnávány oproti expresnímu profilu zdravé tkáně stejné anatomické lokalizace. Největší změna v expresi byla zjištěna pro 4 miRNA specifické pro HPV⁺ OPSCC (miR-9, -29a, -143 a -145). Autoři však poukazují na to, že i když identifikovali 4 miRNA specifické pro HPV⁺ OPSCC s vysokou mírou změny exprese, dle literatury se pouze miR-9 vyskytuje téměř exkluzivně u HPV⁺ OPSCC, zatímco ostatní miRNA se vyskytují i u HPV⁻ nádorů. V širším kontextu jiných studií se jim nepodařilo stanovit profil exkluzivních miRNA pro HPV⁺ OPSCC (Božinović et al., 2019).

Potvrdit existenci tzv. univerzálního miRNA "HPV core", tedy miRNA profilu společného pro nádory pozitivní na HPV v různých anatomických lokalizacích, se pokusili Nunvár s kolegy. Pokusili se identifikovat deregulované miRNA exkluzivní pro všechny HPV-asociované karcinomy. Předpoklad byl, že pokud jsou exprimované virové proteiny (především E6 a E7), tak by měli podobně ovlivňovat miRNA expresní profil. Hodnoceny byly expresní profily miRNA u skupiny HPV⁺ nádorů pomocí sekvenování nové generace (NGS). Soubor zahrnoval cervikální, vulvální, anální a tonzilární nádory. Byla pozorována různorodost mezi typy nádorů co do celkového počtu deregulovaných miRNA. Nejvyšší počet odlišně exprimovaných miRNA byl detekován v cervikálních HPV⁺ nádorech. Bylo zjištěno více miRNA se sníženou než se zvýšenou diferenciální expresí v HPV⁺ cervikálních nádorech, avšak u orofaryngeálních nádorů tomu bylo naopak. Existence takového univerzálního "HPV core" miRNAs, jejichž deregulace je závislá na infekci HPV se nakonec nepotvrdila (Nunvar et al., 2021). Přehled některých vybraných diferenciálně exprimovaných miRNA ze studie Nunvar et al., 2021, diplomové práce Pagáčová, 2020 a studie Vojtechova et al., 2016 je uveden v tabulce 2. "HPV core" miRNA profily Lajera a kol. se nepřekrývají s těmi ze studie Vojtechova et al., 2016 ani s těmi od Nunvar et al., 2021. Různé výstupy pro konkrétní miRNA v různých studiích lze přičíst silnému faktoru, který expresi ovlivňuje více než přítomnost HPV a tím je anatomická lokalizace.

Navíc bylo prokázáno, že rozdíly ve výstupech studií jsou nejen důsledkem použití vzorků různých lokalizací nádoru, ale i různých materiálů z těchto lokalizací (čerstvé mražené vzorky/vzorky fixované ve formalínu). Studie též využívaly různé detekční metody miRNA, což také může ovlivňovat získané výsledky. V neposlední řadě záleží i na statistickém zpracování dat, což má také vliv na rozdílnost výsledků jednotlivých studií (Božinović et al., 2019; Lajer et al., 2012; Nunvar et al., 2021; Vojtechova et al., 2017).

Gen pro miRNA	miRNA	Cervikální HPV ⁺	Orofaryngeální HPV ⁻	Orofaryngeální HPV ⁺
		exprese	exprese	exprese
hsa-miR-133a-3p	MIR133A1	snížená		
hsa-miR-143-3p	MIR143	snížená		
hsa-miR-145-5p	MIR145	snížená		
hsa-miR-133b	MIR133B	snížená		
hsa-miR-762	MIR762	zvýšená		
hsa-miR-142-3p	MIR142	zvýšená		
hsa-miR-451a	MIR451A	snížená	snížená	snížená
hsa-miR-147b	MIR147B	zvýšená		zvýšená
hsa-miR-30a-3p	MIR30A	snížená		
hsa-miR-10a-5p	MIR10A	snížená	snížená	
hsa-miR-145-3p	MIR145	snížená	snížená	
hsa-miR-9-5p	MIR9-1			
hsa-miR-20b-3p	MIR20B			
hsa-miR-20b-5p	MIR20B			
hsa-miR-199a-3p	MIR199A1	snížená		
hsa-miR-21-3p	MIR21			
hsa-miR-139-5p	MIR139	snížená		snížená
hsa-miR-4508	MIR4508	zvýšená		zvýšená
hsa-miR-663a	MIR663A	zvýšená		zvýšená

Tabulka 2: Přehled vybraných diferencially exprimovaných miRNA ze studií Nunváře a jeho kolegů, Vojtěchové a jejich kolegů a Lucie Pagáčové. Modře jsou zvýrazněny miRNA, které nejsou deregulované u žádných orofaryngeálních nádorů. Žlutě je zvýrazněna jediná miRNA deregulovaná u HPV⁺ vulválních tumorů. Červeně jsou zvýrazněny miRNA deregulované pouze v HPV⁺ orofaryngeálních nádorech potvrzené oběma studiemi provedenými Nunvářem a kol. a Vojtěchovou a kol. Fialově jsou zobrazeny miRNA pro orofaryng, kdy Vojtěchové a kol. vyšel opačný směr deregulace než Nunvářovi a kol., zde data od Nunváře a kol. Oranžově jsou znázorněny miRNA, kterými se ve své práci zabývala Lucie Pagáčová. Ve sloupcích označených "exprese" vidíme pravděpodobnou diferencially expresi dané miRNA oproti zdravé tkáni pro konkrétní typ nádoru. Označení "snížená" znamená diferencially sníženou expresi, zatímco "zvýšená" znamená diferencially zvýšenou expresi. Převzato a upraveno dle (Nunvar et al., 2021; Pagáčová, 2020; Vojtechova et al., 2017).

3.3.2 Studium vlivu HPV E6/E7 na funkci miRNA

MikroRNA u HPV⁺ nádorů má spojitost s virovými onkoproteiny E5, E6 a E7. To bylo experimentálně prokázáno pomocí *in vitro* modelů. Je tomu tak nejen u buněčných linií odvozených z cervikálních nádorů, kde je HPV majoritní příčinou vzniku malignit, ale i u buněčných linií odvozených z nádorů orofaryngu. Zang a kol. sledovali dopad exprese proteinu E6 HPV-16

v transfekovaných buňkách na hladinu miR-125b, která vykazovala sníženou hladinu exprese u HPV⁺ OPSCC. Transfekce plazmidu kódujícího HPV-16 E6 protein do buněčných linií Eca 109 a Kyse 150 odvozených od karcinomu jícnu výrazně snížila hladinu exprese miR-125b a podpořila tvorbu kolonií. Obnovení hladiny exprese miR-125b mělo opačný efekt na tvorbu kolonií v buněčných liniích transfekovaných HPV-16 E6 (Zang et al., 2015).

Účinky proteinu E6 a E7 HPV-16 na buňky FaDu (hypofaryngální karcinom) zkoumali Lu s kolegy. K výzkumu byly použity lentivirové vektory, díky kterým byly u buněk FaDu (HPV⁻) exprimovány proteiny E6 a E7. Jako kontroly sloužily netransfekované buňky. Bylo pozorováno, že rychlost apoptózy byla snížena, zatímco proliferace buněk byla zvýšena v transfekovaných buňkách oproti kontrolním buňkám. Transfekované buňky vykazovaly zvýšené hladiny exprese miR-363 a miR-15a. Stejně miRNA vykazovaly zvýšené hladiny i u HPV-16 pozitivních pacientů s nádory hlavy a krku (Lu et al., 2016).

V HPV negativních HT-3 a C-33A buňkách odvozených od karcinomu hrdla děložního kotransfekovaných vektorem, který nesl geny pro HPV16-E6/E7, byla za využití technologie mikro array pozorována snížená exprese miR-454-5p, miR-656-5p, miR-3156-3p, miR-4779-3p, miR-6779-3p a miR-6841-3p. Pomocí RT-qPCR byla též prozkoumána exprese miRNA v HPV16/18 pozitivních cervikálních klinických vzorcích. Výsledky byly poté porovnány s výsledky mikroarray a ukázalo se, že ve všech materiálech dochází k poklesu exprese miR-3156-3p. Pomocí funkčních analýz monitorujících schopnost buněk proliferovat a migrovat zprostředkovaných metodami počítání buněk (*Cell Counting Kit 8*) a kolonkového migračního testu (*transwell*) bylo jisté, že snížená exprese miR-3156-3p vedla ke zvýšené proliferaci a migraci buněk oproti buňkám, kde došlo ke zvýšení této miRNA. Tato zjištění naznačují, že přítomnost proteinu E6 snižuje expresi miR-3156-3p, což vede ke zvýšení proliferace a migrace buněk (Xia et al., 2017).

Umlčení HPV16 E5, E6 a E7 proteinů pomocí siRNA a shRNA v cervikálních HPV⁺ buněčných liniích CaSki a SiHa ukázalo, že ztráta virových proteinů vede ke zvýšení exprese miR-148a-3p, jejíž exprese je v infikovaných buňkách, oproti buňkám zdravé tkáně, snížená. Umlčení pouze E6 a E7 v SiHa buňkách ukázalo zvýšenou expresi miR-199b-5p a miR-190a-5p v těchto buňkách oproti kontrolám, kde k umlčení nedošlo. Zvýšení exprese miR-190a-5p byla pozorována umlčením HPV16 E5 v CaSki (Han et al., 2018).

Studie využívající LNA (*Locked Nucleic Acid*) array ke sledování dopadu HPV16 na expresi miRNA identifikovala u buněk odvozených z orofaryngeálních nádorů (SCC003, SCC089, UMSCC22B, SCC4, HN6) řadu diferenciatně exprimovaných miRNA oproti

HPV⁻ buňkám stejné anatomické lokalizace. Bylo zjištěno že, zvýšená exprese proteinu E6 snížila expresi miR-496, což jak se ukázalo mělo přímý dopad na post-transkripční kontrolu transkripčního faktoru E2F typu 2. Tato miRNA se přímo váže do 3' UTR E2F2, čímž může regulovat hladinu tohoto transkripčního faktoru. Kontrolní zvýšení exprese této miRNA v HPV⁻ buňkách vedlo v tomto případě ke snížení hladiny E2F2 (Mason et al., 2018).

Role onkoproteinů HPV16 a 18 E6/E7 v transformaci buněk HeLa (HPV-18) a CaSki (HPV-16) byla studována Morganem a jeho kolegy. Jejich zjištění přispívá k teorii, že onkoproteiny E6/E7 u HPV hrají roli v deregulaci miRNA. V této studii bylo pozorováno, že proteiny HPV E6 a E7 (u HPV-16 a -18) udržovaly nízkou expresi regulační kinázy STK4 v buňkách karcinomu hrdla děložního zvýšením exprese oncomiR miR-18a, která přímo cílila na 3' UTR mRNA této kinázy. Umlčení miR-18a vedlo ke zvýšení exprese STK4 a aktivovalo Hippo dráhu, což významně snížilo proliferaci buněk odvozených z karcinomu děložního čípku (Morgan et al., 2020).

Výše zmíněné studie dokazují roli virových onkoproteinů, především tedy E6 a E7, v deregulaci miRNA. Role virového onkoproteinu E5 na deregulaci miRNA není příliš studována, v tomto přehledu je pouze jeden článek, který naznačuje, že se deregulace exprese miRNA také účastní.

3.4 Role miR-139-5p a miR-147b

Tato kapitola se zaměřuje na dosud známé cíle a funkce dvou vybraných miRNA ze studií Nunvar et al., 2021; Pagáčová, 2020; Vojtechova et al., 2017. Komplexní seznam studiemi zjištěných cílů miRNA z tabulky 2 je uveden v příloze 1.

3.4.1 miR-139-5p

Tato miRNA ve studii Nunvář a kol. u HPV⁺ nádorů cervixu a orofaryngu měla sníženou expresi (Nunvar et al., 2021). Řada studií analyzovala expresi a funkci této miRNA v nádorech různých anatomických lokalizací (tabulka 3). Výsledky těchto studií ukazují, že role miRNA-139-5p má tumor supresivní funkci (Bao et al., 2022; Hou et al., 2020; Y. Li et al., 2022; Y. Wu et al., 2020).

Dosud žádná studie zatím nestudovala funkci miR-139-5p v HPV⁺ orofaryngeálních nádorech. Jedna ze studií se zaměřila na funkci této miRNA v buněčných liniích (SAS, CAL-27) odvozených z karcinomu jazyka. Tyto buněčné linie byly HPV⁻. Role miR-139-5p byla v této

studii stanovena jako tumor-supresivní. Přirozená exprese byla v těchto buňkách snížena. Zvýšení exprese pomocí transfekce mimikující miRNA vedlo ke snížení schopnosti buněk proliferovat, migrovat a invadovat. Studie dále ukázala, že pravděpodobným cílem této miRNA je mRNA genu *HOXA9*. Tento gen byl vybrán za pomoci databáze TargetScan díky vysoce konzervované vazebné sekvenci pro miR-139-5p v 3' UTR oblasti mRNA genu *HOXA9*. Pomocí RT-qPCR byla pozorována snížená exprese genu *HOXA9* v buňkách, které byly transfekovány mimikující miR-139-5p a zároveň tyto buňky vykazovaly sníženou schopnost proliferace oproti buňkám netransfekovaným. Konkrétní dráha mechanismu inhibice však popsána nebyla (K. Wang et al., 2017).

Další studie se zaměřila na roli miR-139-5p v buňkách odvozených z karcinomu děložního čípku (SiHa, Hela), tedy HPV pozitivních linií (SiHa [HPV16], Hela [HPV18]). Tato studie prokázala pomocí RT-qPCR sníženou expresi miR-139-5p v těchto cervikálních buňkách oproti epitelálním buňkám (Ect1) zdravé tkáně. Transfekce mimikující miR-139-5p do těchto buněk vedla ke zvýšení exprese této miRNA, což mělo za následek snížení schopnosti nádorových buněk migrovat a proliferovat. Pomocí databáze TargetScan bylo predikováno, že cílem miR-139-5p by mohla být 3' UTR oblast mRNA genu *TCF4*, protože obsahuje konzervované vazebné místo pro tuto miRNA. Byl zkonstruován plazmid obsahující luciferázový gen a gen pro *TCF4* včetně 3' UTR, u které byl předpoklad, že je cílem miR-139-5p. Za pomoci luciferázového reportérového testu byl, při ko-transfekci tohoto plazmidu do buněk spolu s miR-139-5p mimikující miRNA, pozorován úbytek fluorescence. Pokles exprese *TCF4* v transfekovaných buňkách mimikující miRNA byl pozorován na proteinové i mRNA úrovni. Mediátorová RNA genu *TCF4* byla cílem miR-139-5p, přičemž účinek této miRNA byl tumor supresivní (Ji et al., 2019).

Druh rakoviny/nádoru	Cílový gen	Funkční role miR	Buňky	Zdroj
Rakovina tlustého střeva	<i>NOTCH1</i>	Tumor supresor	DLD1, HCT116, SW1116	(L. Zhang et al., 2014)
Hepatocelulární karcinom	<i>SPOCK1</i> ; <i>ROCK2</i> ; <i>SLITRK</i> ; <i>ENAH</i> ; <i>FOS</i>	Tumor supresor	HepG2, Hep3b; SMMC-7721, BEL7402; SK-HEP-1, HA22T; L-02, HepG2, BEL-7402, Hep3B, MHCC97H, MHCC97L, HEK293	(Fan et al., 2013; P. Li et al., 2019; Wong et al., 2011; J. Wu et al., 2020; Y. Zhang et al., 2022)
Glioblastom	<i>NOTCH</i> ; <i>MCL-1</i> ; <i>GABRA1</i> ; <i>FTL1</i>	Tumor supresor	LN229, U87; U87, LN229; U251, U87 U87, LN229	(J. Li et al., 2018; R. Y. Li et al., 2013; L. Wang et al., 2021; Q. Wang et al., 2018)
Kolorektální karcinom	<i>BCL2</i> ; <i>AMFR</i> ; <i>NOTCH1</i>	Tumor supresor	HCT116, SW620; HCT-116, LoVo	(Q. Li et al., 2016; Song et al., 2014; L. Zhang et al., 2014)
Rakovina endometria	<i>HOXA10</i>	Tumor supresor	ECC1, Ishikawa	(J. Liu et al., 2018)
Orální spinocelulární karcinom	<i>HOXA9</i>	Tumor supresor	SAS, CAL-27	(K. Wang et al., 2017)
Rakovina močového měchýře	<i>CX43</i> ; <i>PRC1</i> ; <i>MMP11</i>	Tumor supresor	ECV-304; T24, BOY	(Chi et al., 2019; Jia et al., 2020; Yonemori et al., 2016)
Rakovina prostaty	<i>IGF1R</i> , <i>AXL</i>	Tumor supresor	PC3, Du145	(Nam et al., 2019)
Rakovina jícnu	<i>VEGF</i> ; <i>NR5A2</i>	Tumor supresor	KYSE 150; EC109, EC9706, CaEs-17, KYSE150, TE1	(Jiao et al., 2019; R. Liu et al., 2013)
Osteosarkom	<i>DNMT1</i>	Tumor supresor	MG63, U2OS	(Shi & Guo, 2018)
Nemalobuněčný karcinom plic	<i>CCNB1</i> ; <i>c-MET</i> ; <i>IGF1R</i> ; <i>HDGF</i>	Tumor supresor	BEAS-2B, A549; A549, SK-MES-1; A549, SK-MES-1, H520; A549, H1299	(Bao et al., 2022; Sun et al., 2015; Xu et al., 2015; Z. Zhang et al., 2020)
Rakovina žaludku	<i>PMP22</i> ; <i>TPD52</i>	Tumor supresor	SGC7901, BGC823; HGC-27, SGC-7901, MKN-45, AGS GC, GES-1	(Hou et al., 2020; Y. Li et al., 2022)
Hemangion	<i>IGF-1R</i>	Tumor supresor	HemSCs	(Y. Wu et al., 2020)
Karcinom děložního čípku	<i>TCF4</i>	Tumor supresor	CaSki, SiHa, Hela, C-33A	(Ji et al., 2019)
Pankreatický duktální adenokarcinom	<i>Thymopoietin</i>	Tumor supresor	SW1990, ASPC-1, BXPC-3, PANC-1	(Zhou et al., 2019b)
Rakovina slinivky	<i>EZH2</i>	Tumor supresor	SW1990, BxPC-3	(Ma et al., 2018)
Rakovina vaječníků	<i>ROCK1</i>	Tumor supresor	SKOV3, A2780, OVCAR, HO-8910,	(Y. Wang et al., 2018)

Tabulka 3: Tato tabulka shrnuje seznam s cíli miR-139-5p studovanými v různých buněčných liniích. Typy nádorů jsou uvedeny v prvním sloupci, v druhém jsou pak cílové geny, respektive jejich mRNA. Třetí sloupec udává zjištěnou roli miRNA. Čtvrtý sloupec obsahuje použité buněčné linie odvozené od nádorů a poslední, tedy pátý sloupec, obsahuje citace literatury, ze které se čerpalo.

3.4.2 miR-147b

Na expresních profilech miRNA provedených ve studiích Nunvář a kol. a Vojtěchová a kol. měla miR-147b zvýšenou expresi v nádorových buňkách oproti buňkám zdravé tkáně stejné anatomické lokalizace (Nunvar et al., 2021; Vojtechova et al., 2017). Její funkce není jasně dána a u některých typů nádorů se jeví jako tumor supresivní, avšak u jiných zase působí jako oncomiR (Cui et al., 2018; Feng et al., 2020). Zdá se, že miR-147b má duální charakter v závislosti na typu nádoru, respektive použitých buněčných liniích. Studie zkoumající expresi a funkci této miRNA a jejích cílů jsou přehledně uvedené v tabulce 4. Dosud neexistuje studie, která by ověřovala funkci této miRNA v orofaryngálních či cervikálních HPV⁺ nádorech.

Druh rakoviny/nádoru	Cílový gen	Funkční role miR	Buňky	Zdroj
Karcinom prsu	<i>AKT</i>	Tumor supresor	MDA-MB-231	(Y. Zhang et al., 2016)
Kolorektální karcinom	<i>NDUFA4</i>	Tumor supresor	HCT-116, HT29, SW480, LoVo	(Cui et al., 2018)
Kolorektální karcinom	<i>RAP2B</i> ; <i>UBE2N</i>	Onkogen	HT29, SW620; HepG2, Huh 7, 293T, L02	(L. Yi et al., 2019; E. Zhang, Liu, Wang, Wang, He, Jin, & Li, 2017)
Rakovina vaječníků		Tumor supresor	SKOV4	(Kleemann et al., 2017)
Rakovina tlustého střeva	<i>EMPI</i>	Tumor supresor	HCT116, SW480	(C. G. Lee et al., 2014)
Nemalobuněčný karcinom plic	<i>BDNF</i> ; <i>RPS15A</i>	Tumor supresor	16HBE, A549; A549, H1299, H460, H522, BEAS-2B	(F. Li et al., 2020; Ning et al., 2020)
Hepatocelulární karcinom	<i>UBE2N</i>	Onkogen	HepG2, Huh 7, 293T, L02	(E. Zhang, Liu, Wang, Wang, He, Jin, & Li, 2017)
Adenokarcinom plic	<i>MFAP4</i>	Onkogen	A549; Calu-3	(Feng et al., 2020)

Tabulka 4: Tato tabulka shrnuje seznam s cíli miR-147b. Typy nádorů jsou uvedeny v prvním sloupci, v druhém jsou pak cílové geny, respektive jejich mRNA. Třetí sloupec udává zjištěnou roli miRNA. Čtvrtý sloupec obsahuje použité buněčné linie a poslední, tedy pátý sloupec, obsahuje citace literatury, ze které se čerpal.

4 Materiál a metody

Tato práce navazuje na diplomovou práci Mgr. Lucie Pagáčové, která byla vypracována na stejném pracovišti (Pagáčová, 2020).

4.1 Buněčné linie

4.1.1 Použité buněčné linie a média

V této práci byly použity následující buněčné linie:

- UPCI:SCC152 (CRL-3240) (ATCC, USA)
Buněčná linie odvozená od lidského hypofaryngeálního karcinomu, HPV16 pozitivní.
- HTB-43 (FaDu) (ATCC, USA)
Buněčná linie odvozená od lidského hypofaryngeálního karcinomu, HPV negativní.
- HTB-35 (SiHa) (ATCC, USA)
Buněčná linie odvozená od lidského karcinomu děložního hrdla, HPV16 pozitivní.
- HTB-31 (C-33A) (ATCC, USA)
Buněčná linie odvozená od lidského karcinomu děložního hrdla, HPV negativní.

Veškerá práce s buněčnými kulturami probíhala v zapnutém laminárním boxu BioVanguard (Telstar, Španělsko). Složení kultivačních medií se pro jednotlivé buněčné linie lišilo a je shrnuto v tabulce 5.

Kultivační médium	Složky	Finální koncentrace	Výrobce
EMEM1 (CRL-3240)	Minimum Essential Medium Eagle 10×	1×	Sigma-Aldrich, USA
	Fetal Bovine Serum (FBS)	10 % (v/v)	Biosera, Francie
	Gentamicin	50 µg/ml	Sigma-Aldrich, USA
	L-Glutamin GlutaMAX™ Supplement	0,4 mM	Gibco, USA
	MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100×)	1×	Thermo Fisher Scientific, USA
	Sodium Bicarbonate 7.5% (w/v) Solution	0,15 % (w/v)	Gibco, USA
EMEM2 (FaDu, C-33A)	Minimum Essential Medium Eagle 10×	1×	Sigma-Aldrich, USA
	Fetal Bovine Serum (FBS)	10 % (v/v)	Biosera, Francie
	Penicillin-Streptomycin Solution 100×	1×	Biosera, Francie
	HyClone 100× Vitamin Solution	1×	GE Healthcare Life Sciences, USA
	L-Glutamin GlutaMAX™ Supplement	0,4 mM	Gibco, USA
	MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100×)	1×	Thermo Fisher Scientific, USA
	Sodium Bicarbonate 7.5% (w/v) solution	0,15 % (w/v)	Gibco, USA
	Sodium Pyruvate	1 mM	Sigma-Aldrich, USA
RPMI (SiHa)	RPMI 1640 Medium		
	Fetal Bovine Serum (FBS)	10 % (v/v)	Biosera, Francie
	Penicillin-Streptomycin Solution 100x	1×	Biosera, Francie
	Sodium Bicarbonate 7.5% (w/v) solution	0,20 % (w/v)	Gibco, USA

Tabulka 5: Složení kultivačních medií pro jednotlivé buněčné linie.

4.1.2 Práce s buněčnými kulturami

Buněčné linie byly dlouhodobě zamražené v dewarově nádobě s tekutým dusíkem. Rozmrazování všech buněčných linií probíhalo tak, že po vyndání z dusíku se 2ml mikrozkušavky s buňkami a zamrazovacím médiem (příslušné růstové médium bez FBS a s 5% (v/v) DMSO) nechaly rozmraznout při 37 °C. Po rozmrznutí byl obsah těchto mikrozkušavek přenesen do 15ml zkumavky, do které bylo dále přidáno 9 ml příslušného kultivačního média. Následovala centrifugace v centrifuze Universal 320R (Hettich, Německo) po dobu 10 min při $350 \times g$ a 4 °C. Poté se z 15ml zkumavky opatrně odstranil supernatant a pelet se pomocí pipety resuspendoval v 5 ml příslušného kultivačního média (EMEM1 pro CRL-3240, EMEM2 pro FaDu a C-33A, RPMI pro SiHa) vytemperovaného na 37 °C. Celý objem se nakonec pomocí 5ml skleněné pipety přenesl do 25cm² kultivační lahve. Veškeré pipetování probíhalo v zapnutém laminárním boxu, aby se snížilo riziko kontaminace buněčných kultur. Buňky byly inkubovány v inkubátoru MCO 170AIC (Panasonic, Japonsko) při teplotě 37 °C a 5 % CO₂.

První pasáž buněk po rozmražení proběhla za 24 hodin, další pasáže probíhaly pro buněčnou linii CRL-3240 každých 168 hodin a pro buňky FaDu, SiHa a C-33A každých 72 hodin.

Pasážování buněk probíhalo vždy při 80% konfluenci. Nejprve se odstranilo z 25cm² kultivační láhve staré médium a provedl se oplach buněk pomocí 3 ml 0,05% roztoku Trypsin/EDTA (Biosera, Francie). Poté se přidaly 2 ml Trypsin/EDTA a kultivační láhev se umístila do inkubátoru. Inkubace probíhala při 37 °C a 5 % CO₂ po dobu 20 min pro buňky CRL-3240, 10 min pro buňky FaDu a SiHa a 6 min pro buňky C-33A dokud se buňky neodlepily ode dna kultivační lahve. Roztok Trypsin/EDTA byl inaktivován přidáním 3 ml příslušného kultivačního média vytemperovaného na 37 °C. Roztok obsahující Trypsin/EDTA, kultivační médium a buňky byl přenesen do 15ml zkumavky a buňky byly počítány v Bürkerově komůrce. Buňky byly poté nasazovány do 25cm² kultivační lahve v počtech 200 000 buněk pro SiHa a FaDu, a 300 000 buněk pro C-33A a CRL-3240. K buňkám nasazeným do 25cm² kultivační lahve bylo přidáno vždy 5 ml příslušného nového média. Předtím než na buňkách byly prováděny experimenty, prošly buňky vždy alespoň třemi pasážemi po rozmrazení. Zároveň však žádná buněčná linie nepřekročila počet 25 pasáží.

4.2 Výběr kandidátních miRNA a jejich cílových mRNA

Výběr kandidátních miRNA proběhl na základě předchozí práce provedené laboratoří molekulární a nádorové virologie v Biocevu, jejímž výsledkem byly články, na které odkazuje tabulka 2 v kapitole 3.3. Právě tato tabulka zahrnuje miRNA, které byly detailněji prostudovány v literatuře za pomoci webového portálu www.pubmed.gov. Na základě zpracování literatury a dat z tabulky 2 byly vybrány miR-139-5p a miR-147b jako kandidátní miRNA pro funkční analýzu v HPV pozitivních a HPV negativních nádorech.

Na základě cílového skóre v databázi miRDB (<http://www.mirdb.org>) a na základě výsledků databáze TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/) byly vybrány mRNA cílových genů těchto dvou miRNA. Parametry pro výběr cílových mRNA byly hodnoty $\leq 0,3$ pro *Aggregate PCT* a $\leq 0,3$ pro *Cumulative weighted context++ score* v databázi TargetScan a cílové skóre ≥ 90 v databázi miRDB. Ještě před samotným výběrem byly výsledky hledání těchto dvou databází spojeny v překryvech podle výsledného skóre a samotný výběr cílové mRNA proběhl vzhledem k jejich úloze v buněčném cyklu. Návrh a zkouška primerů pro vybrané geny byla provedena TAATA centrem v Biocevu.

4.3 Transfekce mimikující/inhibující miRNA

Buněčné linie byly transfekovány mimikující miR-139-5p (Invitrogen, USA). Jako pozitivní kontrola mimikující miRNA byla použita miR-1 (Invitrogen, USA), která se běžně vyskytuje jen v lidských svalových buňkách a cílí na mRNA genu *HDAC4*. Dále byla použita i negativní kontrola mimikující miRNA a to mirVana™ miRNA Mimic, Negative Control #1 (Invitrogen, USA). Transfekční pokusy byly provedeny vždy v duplikátech a byly provedeny vždy alespoň třikrát pro každou buněčnou linii. Transfekované buňky byly porovnávány s netransfekovanými kontrolami a s kontrolami transfekovanými mimikující negativní kontrolou.

Před samotnou funkční analýzou byla pro jednotlivé buněčné linie optimalizována koncentrace transfekované mimikující/inhibující miRNA. K tomuto účelu bylo využito čtyř ředění pro mimikující miRNA (5 pmol, 15 pmol, 30 pmol, 60 pmol). Poté se pro mimikující miRNA využívala koncentrace 30 pmol pro buněčné linie FaDu a C-33A; 60 pmol koncentrace pro SiHa a 15 pmol koncentrace pro CRL-3240.

Před transfekcí byly buňky kultivovány postupem popsáním v kapitole 4.1.2. Nejdříve po třetí pasáži byly buňky nasazeny na 6jamkovou destičku a to v počtech 3×10^5 pro buňky CRL-3240 a C-33A a v počtech 2×10^5 pro buněčné linie FaDu a SiHa. Jamky na destičce byly

doplněny vždy 1 ml příslušného kompletního média a nechaly se inkubovat v inkubátoru při 37 °C a 5 % CO₂. Dvacet čtyři hodin po nasazení buněk na 6jamkovou destičku bylo kompletní médium odstraněno a bylo přidáno příslušné médium bez antibiotik, avšak stejného složení jako médium kompletní. Destička byla poté umístěna zpět do inkubátoru. Čtyřicet osm hodin po nasazení dosahovala konfluence buněk 30–50 % nutných k transfekci.

Pro každou jamku na destičce byla namíchána směs pro transfekci. Nejprve se smíchalo 245 µl Opti-MEM média (Gibco, USA) s 5 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) a tato směs se nechala inkubovat 5 min při pokojové teplotě. Mezitím se rozpustila 15 pmol (CRL-3240), 30 pmol (FaDu, C-33A) či 60 pmol (SiHa) mimikující miRNA v 250 µl Opti-MEM media. Po uplynulé době se pipetovalo 250 µl směsi s Lipofectaminem 2000 k 250 µl směsi s mimikující miRNA a vše se nechalo inkubovat 20 min při pokojové teplotě. Mezitím bylo na 6jamkové destičce odstraněno staré médium bez antibiotik a byl přidán 1 ml příslušného čerstvého média bez antibiotik o jinak stejném složení. Po uplynutí 20 min se pipetovalo 500 µl transfekční směsi ke konkrétním buňkám na 6jamkové destičce. Destička byla následně umístěna do inkubátoru na 6 hodin, po kterých došlo k výměně média za čerstvé příslušné kompletní médium. Destička s buňkami se nechala dále inkubovat 18 hodin v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5 % CO₂, po kterých se s buňkami pracovalo dále.

4.4 Stanovení proliferace buněk

Proliferační schopnost buněk byla hodnocena pomocí metody MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazoliumbromid). Jedná se o kolorimetrický test pro hodnocení buněčné metabolické aktivity, který je založen na přeměně tetrazoliového barviva MTT na nerozpustný formazan, který má fialovou barvu. Tato přeměna je katalyzována NAD(P)H (nikotinamidadeninukleotidfosfát) oxidoreduktázovými enzymy (*MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation*, n.d.).

U transfekovaných buněk na 6jamkové destičce bylo 18 hodin po ukončení transfekce odstraněno medium a do každé jamky přidán 1 ml 0,05% Trypsin/EDTA roztoku, kterým se opláchly buňky na dně. Následovalo odstranění a opětovné přidání 1 ml Trypsin/EDTA. Buňky byly vystaveny Trypsinu/EDTA v inkubátoru za podmínek a po dobu stejnou jako tomu je popsáno v kapitole 4.1.2, po jejímž uplynutí došlo k resuspendaci buněk proti dnu pomocí 1ml pipety, aby se všechny buňky oddělily ode dna. Následovala inaktivace Trypsin/EDTA pomocí 3 ml/jamka příslušného kompletního média. Poté byly buňky přeneseny do předem připrave-

ných označených 15ml zkušavek. Následné počítání buněk v Bürkerově počítací komůrce určilo počet buněk v 1 ml, z čehož se výpočtem stanovil objem nutný k nasazení požadovaného počtu buněk.

Na čtyři 96jamkové destičky bylo nasazeno vždy 5×10^3 buněk na jamku. Každá destička byla buňkami osazena vždy po 3 sloupcích na vzorek, přičemž v každém sloupci bylo osazeno 6 jamek, které byly na třech ze čtyř destiček doplněny do celkového objemu 200 μ l příslušným kompletním médiem. Na čtvrté destičce byla přidána do všech jamek směs MTT (Duchefa Biochemie, Nizozemí) s příslušným kompletním médiem v objemu 100 μ l popsaná dále. Všechny pokusy byly dělány tedy v technických 18plikátech a byly provedeny vždy v biologických triplikátech. Celkově byly na destičkách 3 vzorky, které byly na všechny destičky nasazeny ve stejném pořadí. Schéma osazení destiček bylo následující: jamky B–G ve sloupcích 2–4 včetně, obsahovaly buňky transfekované mimikující miRNA; tytéž jamky, ale ve sloupcích 5–7 včetně, obsahovaly buňky transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA; opět tytéž jamky ale ve sloupcích 8–10 včetně, obsahovaly buňky stejné buněčné linie, ale netransfekované. Jamky ve sloupcích 1 a 11, a stejně tak i jamky v řádcích A a H byly doplněny 200 μ l $1 \times$ koncentrovaného fosfátového pufru (PBS) (Biosera, Francie) pro zabránění odparu média z jamek s buňkami. Sloupec 12 byl ponechán prázdný. Destičky byly označeny 0 h, 24 h, 48 h a 72 h dle doby, jakou se v nich nechaly buňky růst před přidáním MTT a byly ponechány inkubovat v inkubátoru za podmínek 37 °C a 5 % CO₂.

Na destičce bylo dle jejího označení odebráno kompletní médium i PBS a do všech jamek na destičce bylo pipetováno 100 μ l směsi MTT (5mg/ml v PBS) s příslušným kompletním médiem. Tato směs byla připravena v poměru 1:9 MTT (5mg/ml v PBS) a média. Destička byla posléze nechána 4 hod inkubovat při 37 ° a 5 % CO₂. Poté bylo do každé jamky ke směsi MTT nanášeno pomocí pipety 100 μ l 10% roztoku SDS-HCl. Takto ošetřená destička byla umístěna zpět do inkubátoru. Desetiprocentní roztok SDS-HCl o objemu 500 ml byl připraven smícháním 498,4 ml dH₂O (destilovaná voda), 50 g SDS (dodecylsulfát sodný) (Sigma-Aldrich, USA) a 1,6 ml 37% HCl (kyselina chlorovodíková) (Sigma-Aldrich, USA).

Druhý den po rozpuštění formazanových krystalů byla změřena absorbance všech jamek pomocí spektrofotometru Infinite® 200 PRO NanoQuant (Tecan, Švýcarsko). Měření probíhalo bez krytu destičky při vlnové délce 565 nm a předcházelo mu 5s orbitální míchání provedené měřícím přístrojem. Výsledky měření získané ze spektrofotometru byly zpracovány v programu Excel z balíku Office 365 (Microsoft, USA) a vizualizovány pomocí programu GrafPad Prism 7.0 (GrafPad software Inc., USA).

4.5 Stanovení migrace buněk

4.5.1 Transwell migrační test

Tato metoda sleduje schopnost buněk migrovat přes membránu opatřenou póry o definované velikosti na základě gradientu živin. Pro sledování této schopnosti byly využity transwellové kolonky SPLInsert™ Hanging (SPL Life Sciences, Korea) s velikostí pórů 8.0 µm.

U transfekovaných i netransfekovaných buněk na 6jamkové destičce po 18 hodinách od transfekce bylo nejprve odstraněno medium a následná práce s nimi probíhala podle popisu pasážování buněk v kapitole 4.1.2 až do jejich spočítání.

Na 24jamkové destičce se do jamky nanese 600 µl příslušného kompletního média a poté se do této jamky vložila transwellová kolonka. Do kolonky bylo pipetováno 200 µl příslušného média bez FBS a destička i s kolonkou byly umístěny na 30 min do inkubátoru. Poté bylo na střed kolonky naneseo vždy 8×10^4 buněk a kolonka byla doplněna médiem bez FBS do výsledného objemu 500 µl. Destička byla posléze inkubována v inkubátoru po dobu 26 hodin při 37 °C a 5 % CO₂.

Z destičky byla po uplynulé době inkubace vyjmuta kolonka a médium z ní bylo pomocí pipety opatrně odstraněno. Pro fixaci buněk na membráně kolonky se do vedlejší jamky nanese 700 µl 70% ethanolu a následně se do této jamky vložila kolonka. Fixace probíhala 15 min. Do další prázdné jamky se mezitím nanese 700 µl 0.5% barviva Crystal violet (Sigma-Aldrich, USA), do níž byla po fixaci buněk kolonka přenesena. Barvení probíhalo po dobu 3 min a následovalo řádné promytí kolonek v kádince s vodou tak, že se do kádinky ponořila celá kolonka a tím se omylo přebytečné barvivo. Po promytí byl vnitřek kolonek pomocí navlhčené vaty a pinzety očištěn, aby buňky, které neprorostly přes membránu, netvořily při detekci pozadí. Kolonky se nechaly 1 hod ve 24jamkové destičce zaschnout při pokojové teplotě. Nakonec byla membrána pomocí invertovaného mikroskopu Olympus IX71 (Olympus, Japonsko) se zvětšením objektivu 10× alespoň na pěti místech nafocena. Metoda transwell byla provedena třikrát pro každý vzorek. Vzorky obsahovaly vždy buňky transfekované mimikující miRNA, negativní kontrolou mimikující miRNA a netransfekované buňky stejné buněčné linie jako buňky transfekované.

Tuto metodu se nepodařilo optimalizovat pro většinu buněčných linií, proto se přistoupilo k jiné metodě ověřující schopnost buněk migrovat, a to k metodě hojení ran (z angl. Scratch Wound Healing Assay, SWHA).

4.5.2 Scratch wound healing assay (SWHA)

Metoda hojení ran byla, jak již bylo řečeno, zvolena pro svoji jednoduchost a také proto, že se transwellová metoda pro sledování migrace buněk ukázala problematickou při optimalizaci pro většinu buněčných linií. Metoda hojení ran byla prováděna v duplikátech a byla provedena třikrát pro každý vzorek. Vzorky obsahovaly vždy buňky transfekované mimikující miRNA, negativní kontrolou mimikující miRNA a netransfekované buňky stejné buněčné linie jako buňky transfekované. Metoda SWHA byla provedena vždy 18 hodin po transfekci.

Nejprve byly buňky opláchnuty 0,05% roztokem trypsin/EDTA. Následovalo odstranění oplachového roztoku a za pomoci 1ml pipetové špičky došlo k vytvoření rovné „rány“ na buněčné monovrstvě, která prořala jamku na dvě shodné poloviny. Na každý vzorek byla použita nová špička. Jamky s „ránou“ byly následně opláchnuty 2 ml 1× koncentrovaného PBS a posléze doplněny 1 ml příslušného kompletního média vytemperovaného na 37 °C. Vzorky a jejich „rány“ byly foceny na invertovaném mikroskopu Nikon Eclipse TE2000-S (Nikon, Japonsko) přes objektiv se zvětšením 4× v programu NIH elements. Rány byly fixou zesponu destičky rozděleny na čtyři pomyslné části pro lepší orientaci při focení. Focení proběhlo v čase 0 hod od provedení rány, 6 hod od provedení rány a 24 hod od provedení rány. Fotky byly následně analyzovány pomocí programu ImageJ (NIH, USA), data byla zpracována pomocí programu Excel z balíku Office 365 (Microsoft, USA) a vizualizována pomocí programu GrafPad Prism 7.0 (GrafPad software Inc., USA).

4.6 Izolace RNA z buněčných linií

Izolace RNA byla provedena pomocí mirVana™ Isolation Kit s fenolem (Ambion, USA), přičemž se postupovalo dle firemního protokolu. Izolace RNA z buněk transfekovaných mimikující miRNA či inhibitory miRNA a jejich kontrol proběhla 48 hod po transfekci a izolovaná RNA byla použita pro ověření exprese transfekovaných miRNA, ale i pro ověření změny exprese cílové mRNA těchto miRNA a jejich kontrol. Kontrola čistoty práce při izolaci RNA byla provedena pomocí zavedení vzorku označeného jako kontrola izolace, který neobsahoval buňky ale pouze použité roztoky.

Buňky byly v 15ml zkumavkách centrifugovány v centrifuze Universal 320R (Hettich, Německo) po dobu 10 min při 350 × g a 4 °C. Supernatant byl po centrifugaci odstraněn a pelet resuspendován v 1 ml 1× koncentrovaném PBS. Vše bylo přeneseno do 1,5ml mikrozukavky, která byla opět centrifugována po dobu 10 min při 350 × g a 4 °C v odstředivce Centrifuge 5424R (Eppendorf, Německo).

Supernatant byl šetrně odstraněn a bylo přidáno 400 μ l Lysis/Binding pufru. Vše bylo resuspendováno a vzorek byl následně inkubován až do úplné lýze buněk. Poté se přidalo 40 μ l roztoku miRNA Homogenate Additive, vše se důkladně promíchalo a nechalo inkubovat 10 min na ledu. Následovalo přidání 400 μ l směsi kyselého fenol-chloroformu, vše se opět důkladně promíchalo a centrifugovalo v odstředivce po dobu 5 min při $10\,000 \times g$. Horní vodná fáze byla opatrně odebrána a přenesena do připravené nové 1,5ml mikrozkušavky, k ní bylo přidáno 563 μ l 100% etanolu a vše bylo řádně promícháno. Směs pak byla po 700 μ l nanášena na filtrační kolonky připravené v 1,5ml sběrných mikrozkušavkách, které byly následně centrifugovány v odstředivce po dobu 30 s při $10\,000 \times g$. Přefiltrovaná tekutina byla slita a postup se opakoval, dokud se nepřefiltroval všechny vzorek. Po tomto přefiltrování následovaly promývací kroky, nejprve se na kolonku pipetovalo 700 μ l promývacího roztoku 1 (miRNA Wash 1 Solution 1). Tento krok byl následován centrifugací v odstředivce po dobu 1 min při $10\,000 \times g$, dále bylo $2\times$ pipetováno 500 μ l promývacího roztoku 2/3 (miRNA Wash Solution 2/3), přičemž po každém pipetování proběhla 30s centrifugace v odstředivce při $10\,000 \times g$. Po konečném odstranění promývacího roztoku proběhla ještě závěrečná centrifugace v odstředivce po dobu 2 min při $10\,000 \times g$. Kolonka byla poté přenesena do čistých sběrných 1,5ml mikrozkušavek a na střed filtru kolonky bylo pipetováno 50 μ l elučního roztoku vytemperovaného na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tento krok byl zakončen centrifugací v odstředivce po dobu 1 min při $20\,000 \times g$ a posléze opakován s dalšími 50 μ l vytemperovaného elučního roztoku a opětovnou centrifugací. Koncentrace RNA byla měřena na NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Vzorky izolované RNA byly uchovány v mrazničce při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.7 Stanovení exprese miRNA v buněčných liniích

K ověření změny exprese vybraných miRNA v použitých buněčných liniích byla použita dvoukroková metoda RT-qPCR. Při této metodě byly využity specifické TaqMan MicroRNA sondy dodávané spolu se specifickými primery (Thermo Fisher Scientific, USA) a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Jako templát byla použita RNA izolovaná z buněčných linií postupem popsáním v kapitole 4.5.

Příprava směsi pro reverzní transkripci o celkovém výsledném objemu 15 μ l probíhala na ledu v laminárním boxu. Nejprve bylo připraveno 7 μ l směsi, která obsahovala $1\times$ koncentrovaný RT pufr, 1 mM dNTPs, 50 U MultiScribe™ reverzní transkriptázy, 3,8 U RNase inhibitoru a 3,81 μ l vody bez RNáz (BioRad, USA). K této směsi byly následně přidány 3 μ l $5\times$ koncentrovaného příslušného primeru a 10 ng RNA v 5 μ l vody prosté RNáz. Vždy byla použita

negativní kontrola reverzní transkripce, kdy se ke směsi s primerem místo templátové RNA přidala voda prostá RNáz. Také byla vždy použita pozitivní kontrola, kdy se ke směsi s primerem přidala RNA buněčné linie. Připravené vzorky byly ponechány 5 min na ledu a poté vloženy do cycleru GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA) za podmínek: 16 °C po dobu 30 min, 42 °C po dobu 30 min, 85 °C po dobu 5 min. Po proběhnutí reverzní transkripce byla komplementární DNA (cDNA) umístěna na led.

Pro vytvoření pětibodové standardní křivky byla vytvořena ředící řada cDNA získané reverzní transkripcí. Standardní křivka využívala cDNA neředěnou a dále pak 3×, 9×, 27× a 81× ředěnou. Jednotlivá ředění byla pipetována k reakčnímu mixu do 0,1ml mikrozkušavek vždy v triplicátech a křivka byla stanovena pro všechny použité buněčné linie a to jak transfekované miR-1, tak i miR-139-5p mimikující miRNA. Analýza změny exprese byla provedena na 3× ředěné cDNA. Pro normalizaci dat byla použita referenční krátká jaderná RNA RNU48, která byla již dříve použita k analýze diferenciální exprese miRNA RNDr. Zuzanou Vojtěchovou, Ph.D. a Mgr. Lucií Pagáčovou. RNU48 byla spolu s dalšími referenčními RNA vybrána na základě literatury jako krátká RNA se stabilní expresí. Následně byla určena jako expresně nejstabilnější ze zvolených referenčních RNA (Vojtechova et al., 2016).

Reakce pro qPCR o celkovém objemu 10 µl se skládala z 1× koncentrovaného TaqMan Universal PCR MasterMix, no AmpErase UNG (Thermo Fisher Scientific, USA) 1× koncentrované příslušné TaqMan sondy (viz tabulka 6), 2 µl cDNA a 2,5 µl vody prosté RNáz. Každý vzorek byl připraven a pipetován do 0,1ml mikrozkušavek v triplicátech. Vždy byla použita i negativní kontrola qPCR, kdy se ke směsi se sondou místo templátové cDNA přidala voda prostá RNáz. Amplifikační reakce probíhala v cycleru RotorGene 3000 (Qiagen, Německo) za následujících podmínek: inkubace 2 min při 50 °C, aktivace polymerázy 10 min při 95 °C, 40 cyklů skládajících se z 95 °C po dobu 15 s a 60 °C po dobu 60 s.

Amplifikační křivky byly hodnoceny softwarem Corbett RotorGene 6000 v.1.7. (Qiagen, Německo). K výsledným křivkám byla importována hodnota prahu detekce fluorescence (*threshold*). Ta byla pro danou sondu stanovena pomocí standardních křivek, čímž byly získány Ct (*cycle of treshold*) hodnoty vzorků. Jako vzorky byly použity 3× ředěné cDNA pro sledování hladiny exprese miRNA po transfekci. Analýza relativní kvantifikace byla prováděna pomocí softwaru GenEx v.6 (MultiD Analyses AB, Švédsko).

Při analýze optimalizace množství transfekované miRNA do buněk byly hodnoceny amplifikační křivky. Replikáty křivek, které se vzájemně značně lišily, byly pro přehlednost odstraněny.

Při analýze relativní kvantifikace pro účely ověření změny exprese miRNA v transfekovaných buněčných liniích bylo stanoveno ΔCt , aby se hodnoty daly normalizovat, a to dle následujícího postupu, při kterém byla použita 3× ředěná cDNA:

$$\Delta Ct_{\text{vzorek}} = Ct_{\text{vzorek, cílová miRNA}} - Ct_{\text{vzorek, referenční RNA (RNU48)}}$$

$$\Delta Ct_{\text{kalibrátor (negativní kontrola mimikující miRNA)}} = Ct_{\text{kalibrátor, cílová miRNA}} - Ct_{\text{kalibrátor, referenční RNA (RNU48)}}$$

Poté bylo určeno $\Delta\Delta Ct$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{vzorek}} - \Delta Ct_{\text{kalibrátor}}$$

a pro relativní kvantifikaci sledované miRNA mezi kontrolním vzorkem a testovaným vzorkem bylo vyjádřeno jako $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

TaqMan MicroRNA sonda	Sekvence maturované miRNA
hsa-miR-139-5p	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG
hsa-miR-1	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA
hsa-miR-147b	GTGTGCGGAAATGCTTCTGCTA
TaqMan MicroRNA kontrolní sonda	Kontrolní sekvence
RNU48	GATGACCCAGGTAAGTCTGAGTGTGTCG

Tabulka 6: Přehled použitých TaqMan MicroRNA sond pro transfekované buňky.

4.8 Stanovení exprese cílových mRNA

K ověření změny exprese vybraných mRNA v buněčných liniích byla, stejně jako v případě ověření exprese miRNA, použita dvoukroková metoda RT-qPCR. Pro reverzní transkripci RNA z buněčných linií byl využit iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, USA) obsahující mix náhodných hexamerů a oligo(dT). Pro následné qPCR byl využit Xceed qPCR SG 2x Mix Lo-ROX Kit (IAB, Česká republika) a specifické primery (TATAA Biocenter, Česká republika) viz tabulka 7. Jako templátová RNA byla použita RNA izolovaná z buněčných linií získaná postupem popsáním v kapitole 4.6.

Příprava reakce pro reverzní transkripci o celkovém objemu 20 μ l probíhala na ledu v laminárním boxu. Tato směs se skládala z 1× koncentrovaného iScript Reaction Mixu, 1 μ l iScript Reverse Transcriptase a vody prosté RNáz. K mixu byl následně pipetován 1 ng templátové RNA. K reakci byla vždy přidána též negativní kontrola reverzní transkripce, kdy se místo templátové RNA přidala ke směsi voda prostá RNáz. Též byla pro každý izolát zahrnuta kontrola kontaminace DNA v izolované RNA, kdy ke směsi pro reverzní transkripci s templátovou RNA nebyla přidána reverzní transkriptáza. Hotová směs se inkubovala 10 min na ledu a poté byla vložena do cycleru GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, USA) za podmínek: 16 °C po dobu 5 min, 46 °C po dobu 20 min, 95 °C po dobu 1 min.

Po reverzní transkripci následovalo qPCR. Reakce pro qPCR o celkovém objemu 10 μ l byla pipetována v laminárním boxu a skládala se z 1 \times koncentrovaného Xceed mixu; příslušných forward a reverse primerů o výsledných koncentracích 0,4 μ M a vody prosté RNáz. Použité primery jsou v tabulce 7. Směs byla následně pipetována do 0,2ml mikrozkušavek v chladícím stojánku a bylo k ní přidáno 1,5 μ l příslušné cDNA. K reakci byla pro každý primer též přidána kontrola qPCR, kdy se jako templát použila voda prostá RNáz. Vzorky byly vždy provedeny v technických duplikátech. Amplifikační reakce probíhala v cycleru RotorGene 3000 (Qiagen, Německo) za následujících podmínek: aktivace polymerázy 10 min při 95 °C následovaná 40 cykly skládajících se z 95 °C po dobu 15 s a 60 °C po dobu 60 s a na závěr amplifikační reakce po 40. cyklu se provedlo tání v rozmezí teplot 55–95 °C.

Hodnocení amplifikačních křivek a analýzy relativní kvantifikace byly provedeny stejným způsobem jako je tomu popsáno v kapitole 4.7. Standardní křivky použité pro analýzu relativní kvantifikace byly pětibodové a byly vytvořeny stejným postupem jako je to popsáno v kapitole 4.7. Pro normalizaci dat byl na základě databáze Genevestigator (ver. 9.3.0) vybrán a použit referenční gen pro hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázu (HPRT), protože je stabilně exprimován v nízkých hladinách (Hruz et al., 2008). Stejný referenční gen byl využit u stejných buněčných linií Mgr. Lucii Pagáčovou a Mgr. Natálií Dalewskou (Dalewská, 2021; Pagáčová, 2020).

miRNA	Pravděpodobný cíl	Primer	Sekvence
hsa-miR-139-5p	FOS	hFOS_F	TCTTACTACCACTCACCCGCA
		hFOS_R	GAATGAAGTTGGCACTGGAGAC
hsa-miR-139-5p	GDF10	GDF10_F	CCGAAATCTTTTGATGCCTACTAC
		GDF10_R	GCATGGTTGGATGGACGA
hsa-miR-139-5p	KIF13A	KIF13A_F	ACACAATAGCAAACGTGAGAAGA
		KIF13A_R	CAGCAAACCTCCACAGGTACATAA
hsa-miR-139-5p	JUN	hJUN_F	GAACTCGGACCTCCTCACCT
		hJUN_R	TCATCTGTACGTTCTTGGGG
hsa-miR-147b	RAP2B	RAP2B_F	ACTCTGGTGGAAATGTGGCTC
		RAP2B_R	GTGTCAAGCTGCCGATACTG
hsa-miR-147b	NDUFA4	NDUFA4_F	TCAATCCAGATGTTTGTGGGAC
		NDUFA4_R	GCTTGCTGTAATCCACATTCCT
hsa-miR-147b	MID1IP1	MID1IP1_F	TTTTCTTCTGGAGTTTCCCC
		MID1IP1_R	GGGTTTCTTTCTCTCCCTCTTTC
hsa-miR-1	HDAC4	HDAC4_F	AGGCTCAGACTTGCAGAAC
		HDAC4_R	ATGGGCTCCTCATCTGGTCT
referenční gen	HPRT	HPRT_F	CACTGGCAAACAATGCAGACT
		HPRT_R	GTCTGGCTTATATCCAACACTTCG T

Tabulka 7: Přehled použitých primerů pro ověření změny exprese mRNA, jež jsou cílem vybraných miRNA.

4.9 Statistická analýza

Data z SWHA a MTT byla analyzována pomocí dvousměrné analýzy variance (ANOVA) v programu GraphPad Prism 7.0 (GraphPad software Inc., USA). Hranice signifikance byla stanovena jako hodnota p (p -value) $\leq 0,05$ a signifikantní změna hodnoty \log_2 u změny exprese miRNA jako $>1,58$ FC (*fold-change*).

5 Výsledky

5.1 Výběr kandidátních miRNA

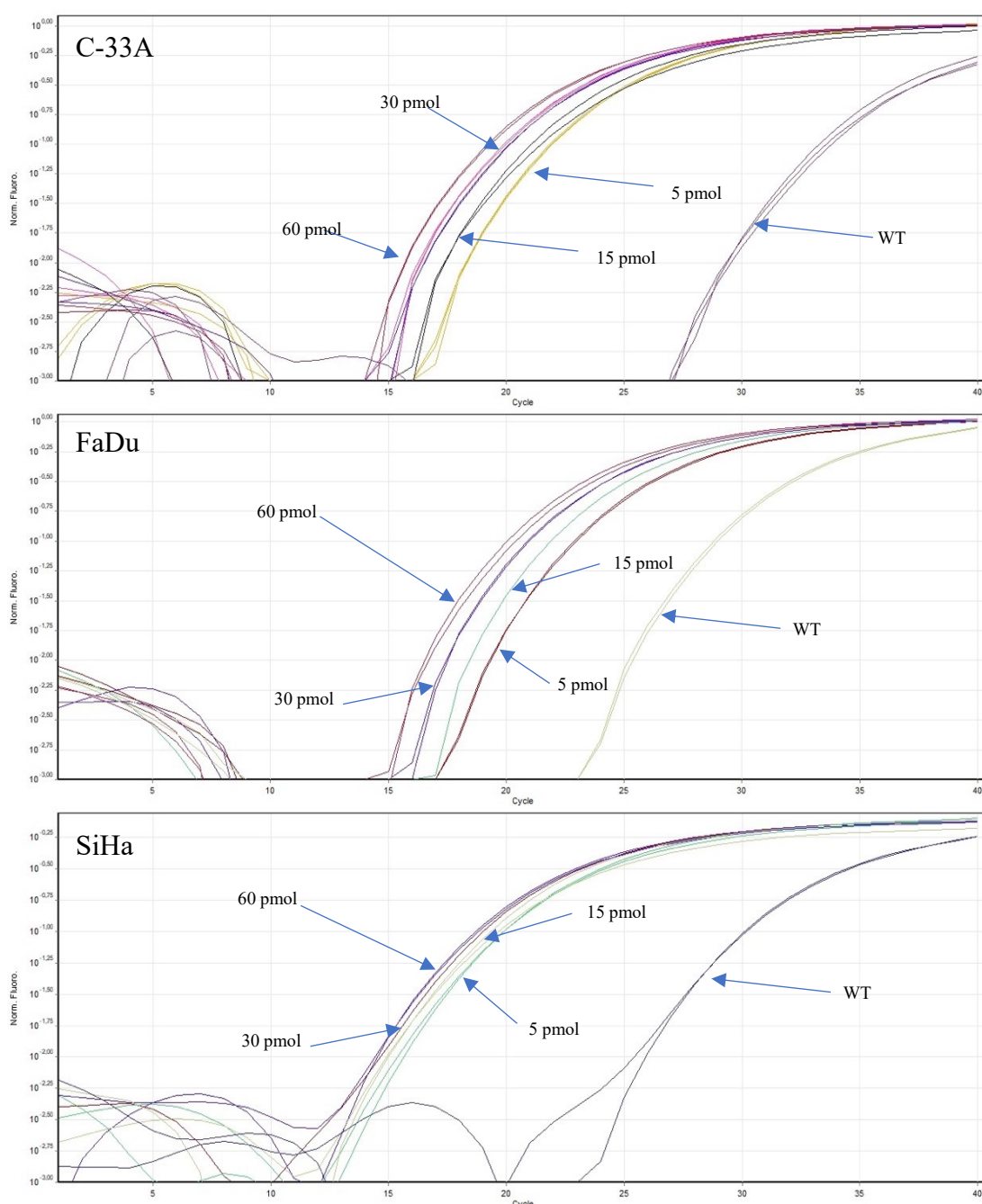
Výběr kandidátních miRNA proběhl na základě předchozí práce provedené laboratoří molekulární a nádorové virologie v Biocevu, jejímž výsledkem byly články, na které odkazuje tabulka 2 v kapitole 3.3. Právě tato tabulka zahrnuje miRNA, které byly detailněji prostudovány v literatuře za pomoci webového portálu www.pubmed.gov (klíčová slova: cancer, HPV, miR [konkrétní číslo], role). Na základě zpracování literatury a dat z tabulky 2 byl vypracován přehled kandidátních miRNA (viz. příloha 1) a jejich cílů v různých typech nádorů. Poté byly vybrány miR-139-5p a miR-147b jako kandidátní miRNA pro funkční analýzu v HPV⁺ a HPV⁻ nádorech, u kterých byly předpokládány funkce tumorsupresivní pro miR-139-5p a onkogenní u miR-147b.

5.2 Transfekce a ověření změn exprese miRNA v transfekovaných buněčných liniích

Z předchozích studií bylo zřejmé, že miR-139-5p má sníženou expresi v nádorech orofaryngu, zatímco miR-147b má v těchto nádorech expresi zvýšenou (Nunvar et al., 2021; Pagáčová, 2020). Na základě toho se přistoupilo k funkční studii miR-139-5p a již se nesledoval rozdíl v expresi miRNA mezi zdravou a nádorovou tkání. Buněčné linie použité v této diplomové práci, viz kapitola 4.1.1, byly postupně transfekovány mimikující mikroRNA miR-139-5p a následně byl sledován účinek transfekce. Transfekce proběhla postupem popsaným v kapitole 4.3 a byla následována izolací celkové RNA postupem popsaným v kapitole 4.6.

Samotné transfekci předcházelo optimalizování množství buněk nasazených na 6jamkovou destičku pro všechny buněčné linie. Na destičku byly v duplikátu nasazeny a následně kultivovány buňky v počtu 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 a po dobu 4 dnů byly sledovány každých 24 hodin pod mikroskopem. Pro transfekci byly vybrány počty 2×10^5 pro FaDu a SiHa, 3×10^5 pro CRL-3240 a C-33A z důvodu jejich pomalejšího růstu.

Pro účely optimalizace transfekce mimikující miRNA byla použita miR-139-5p v látkovém množství 5 pmol, 15 pmol, 30 pmol a 60 pmol v buněčných liniích FaDu, SiHa a C-33A, viz obrázek 4. Též byla zahrnuta netransfekovaná kontrola označená jako WT. Všechny negativní kontroly vyšly negativně a nejsou v obrázku 4 uvedeny. Pro buněčné linie C-33A a FaDu bylo stanoveno optimální množství mimikující miRNA jako 30 pmol, pro linii SiHa jako 60 pmol. Optimální látkové množství mimikující miRNA pro transfekci buněčné linie CRL-3240 stanovila ve své diplomové práci Mgr. Lucie Pagáčová na 15 pmol (Pagáčová, 2020).



Obrázek 4: Logaritmičké křivky optimalizace transfekce mimikující miRNA miR-139-5p v látkovém množství 5, 15, 30 a 60 pmol v buněčných liniích FaDu, SiHa a C-33A. WT značí netransfekované buňky dané buněčné linie. Vzorčky byly naneseny v triplicátech.

Pro ověření změn exprese byly použity specifické TaqMan MicroRNA sondy dodávané spolu se specifickými primery a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit. Postup pro ověření změn exprese je popsán v kapitole 4.7. Pětibodová standardní křivka byla vytvořena pomocí ředící řady pro referenční RNA RNU48 a dále pro miRNA miR-1, miR-139-5p pro všechny použité buněčné linie. Ředící řady byly provedeny pro stanovení hodnoty prahu detekce a pro ověření efektivity amplifikace. Hodnoty prahu detekce a efektivit amplifikací, které byly získány pro jednotlivé buněčné linie a použité TaqMan MicroRNA sondy, jsou zobrazeny v tabulce 8. Hodnoty efektivity amplifikace vyšší než 1,3 byly v programu GenEx nahrazeny hodnotou 1,3, protože to je maximální hodnota, se kterou je tento program schopný pracovat.

Buněčná linie	TaqMan sonda	Hodnota prahu detekce	Efektivita
CRL-3240	miR-139-5p	0,0868	0,64
	miR-1	0,0436	0,73
	RNU48	0,1892	0,86
FaDu	miR-139-5p	0,0092	~1,48
	miR-1	0,0196	1,07
	RNU48	0,1380	1,02
SiHa	miR-139-5p	0,0092	1,25
	miR-1	0,0036	~1,79
	RNU48	0,0076	0,86
C-33A	miR-139-5p	0,0156	1,03
	miR-1	0,0060	0,86
	RNU48	0,0072	0,81

Tabulka 8: Hodnoty prahu detekce a efektivit amplifikací, které byly získány pro jednotlivé buněčné linie a použité TaqMan MicroRNA sondy. Symbol ~ značí hodnoty efektivity nahrazené v softwaru GenEx hodnotou 1,3.

Hodnoty Ct, tedy čísla cyklů, ve kterých dochází k překročení prahu fluorescence příslušných vzorků v technických triplicátech, jsou zobrazeny v tabulce 9 a byly určeny přiřazením hodnoty prahu detekce získané z pětibodové ředící řady k výsledným křivkám příslušných vzorků. Pozitivní kontrola transfekce, tedy miR-1, se vyskytuje pouze v lidských svalových buňkách. V buňkách transfekovaných touto miRNA byla detekována. Nebyla ale detekována v netransfekovaných buňkách ani v buňkách transfekovaných negativní kontrolou mimikující miRNA, a proto není zanesena v tabulce 9.

Buňky	Sonda	Ct miR-139-5p	Ct NKM
CRL-3240	miR-139-5p	23,50	32,71
		23,61	33,31
		23,70	33,66
	RNU48	27,46	27,07
		27,68	27,65
		28,11	25,89
FaDu	miR-139-5p	17,40	30,37
		17,35	30,66
		16,50	29,58
	RNU48	25,50	25,50
		25,89	25,39
		26,59	25,67
SiHa	miR-139-5p	20,38	32,29
		20,53	34,25
		20,59	33,03
	RNU48	20,82	20,69
		21,16	21,01
		20,58	20,79
C-33A	miR-139-5p	18,85	30,95
		17,29	31,71
		17,86	32,59
	RNU48	18,25	19,34
		18,69	19,15
		18,41	18,86

Tabulka 9: Ct hodnoty technických triplikátů vzorků použitých pro analýzu změny exprese miRNA. Použitá cDNA z příslušných buněčných linií byla 3× ředěná. Sloupec Ct miR-139-5p uvádí Ct hodnoty pro vzorky dané buněčné linie transfekované touto mimikující miRNA, zatímco sloupec Ct NKM uvádí Ct hodnoty pro vzorky dané buněčné linie transfekované negativní kontrolou transfekce miRNA Mimic Negative Control.

Ct hodnoty byly následně importovány do programu GenEx, kde byla provedena analýza ověření změny exprese miRNA. Analýza proběhla následujícím způsobem: nejprve byla provedena korekce efektivity amplifikace, dále byl vytvořen průměr Ct hodnot vzorků v triplikátech a jednotlivé vzorky byly nakonec normalizovány díky porovnání s expresí referenční RNA RNU48. Bylo tedy stanoveno ΔCt pro jednotlivé vzorky, jak lze vidět v tabulce 10.

Vzorek	miR-139-5p	NKM
CRL-3240	-12,90	-4,25
FaDu	-10,11	5,35
SiHa	-5,73	5,75
C-33A	-8,79	2,48

Tabulka 10: Shrnutí ΔCt hodnot pro jednotlivé buněčné linie a vzorky transfekované buď negativní kontrolou mimikující miRNA (NKM) nebo mimikující miRNA (miR-139-5p) normalizované na referenční RNA RNU48.

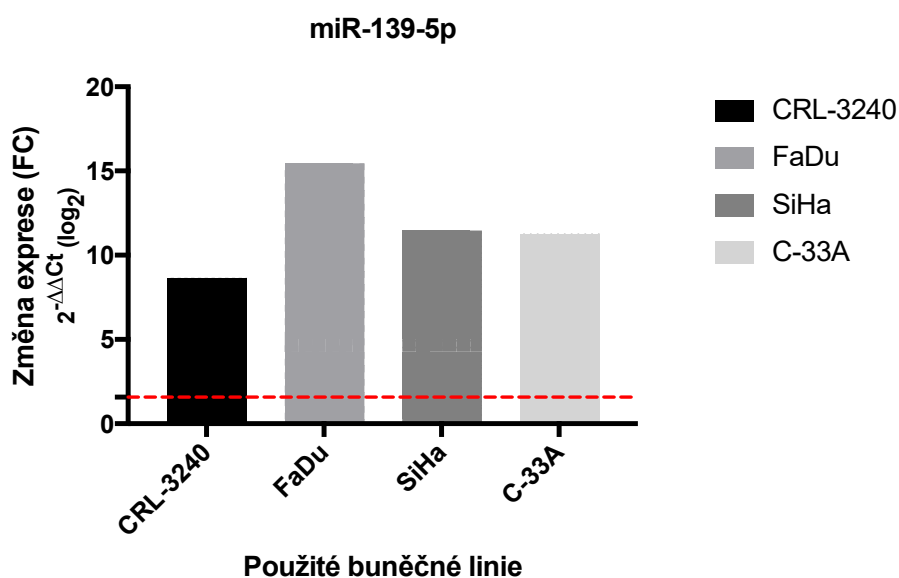
Po stanovení hodnot ΔCt byla provedena relativní kvantifikace exprese sledované miRNA ve všech použitých buněčných liniích. Ke kalibraci byly použity buňky příslušných buněčných linií, které byly transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA (NKM),

čímž se určily hodnoty $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2) u všech buněčných linií. Jde tedy o \log_2 změny exprese (FC, fold change) studované miRNA.

Přehled $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2) hodnot (hodnot změny exprese) je zobrazen v tabulce 11. Kladné hodnoty znamenají zvýšení exprese studované miRNA v porovnání s kontrolami transfekovanými NKM. U všech transfekovaných buněčných linií došlo k signifikantnímu zvýšení exprese oproti netransfekovaným buněčným liniím ($FC > 1,58$). U linie CRL-3240 došlo ke zvýšení exprese 8,65×, u linie FaDu 15,46×, u linie SiHa 11,48× a u linie C-33A 11,27×. Na grafu 1 je zobrazena změna exprese miR-139-5p v jednotlivých transfekovaných buněčných liniích v porovnání se stejnými buněčnými liniemi, které byly transfekované NKM. Z grafu 1 lze vyčíst, že došlo ke zvýšení exprese miR-139-5p ve všech použitých buněčných liniích oproti stavu v NKM, na kterou jsou hodnoty vztaženy.

Vzorek	miR-139-5p
CRL-3240	8,65
FaDu	15,46
SiHa	11,48
C-33A	11,27

Tabulka 11: Přehled $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2) hodnot v jednotlivých použitých buněčných liniích.

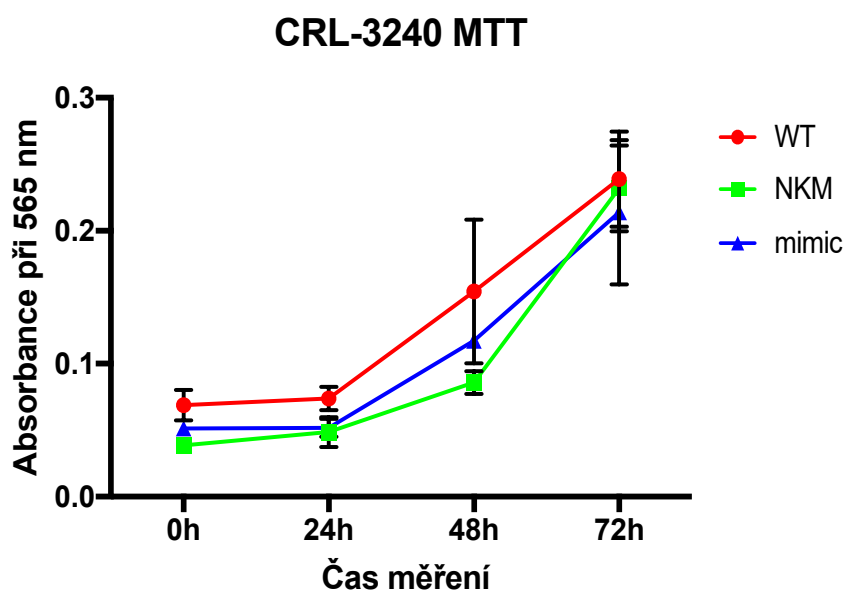


Graf 1: Graf hodnot $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2) pro miR139-5p v použitých buněčných liniích. Osa x – jednotlivé buněčné linie, osa y – změna exprese (FC, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2)). Červená linie ukazuje \log_2 hodnoty změny exprese $FC > 1,58$.

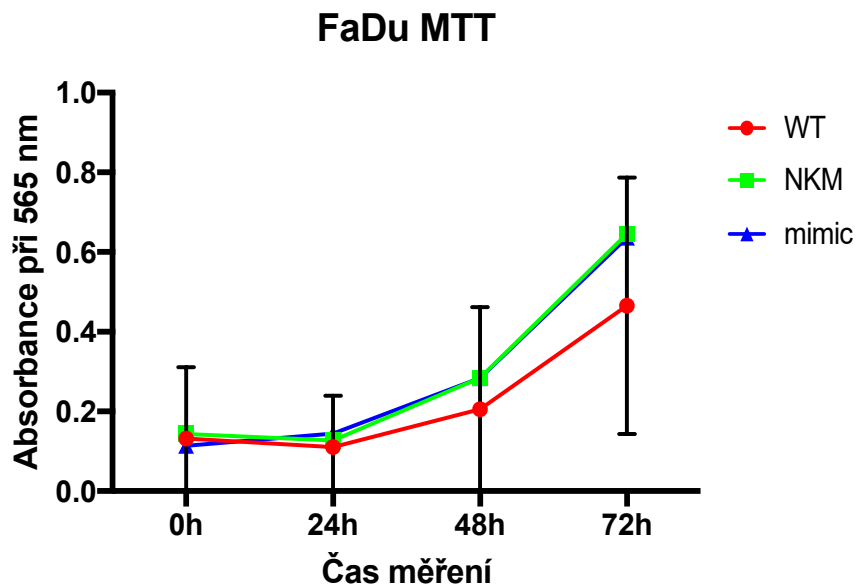
5.3 Ověření změn proliferace

Proliferační schopnost buněk byla hodnocena pomocí metody MTT. Buňky použitých buněčných linií byly nejprve transfekované způsobem popsáním v kapitole 4.3 a poté byly v definovaných počtech a osazeních přesazeny na čtyři 96jamkové destičky a kultivovány požadovaný čas postupem popsáním v kapitole 4.4. Po rozpuštění formazanových krystalů a změření absorbance všech jamek pomocí spektrofotometru byly získány hodnoty absorbance pro všechny vzorky ve všech osazených jamkách.

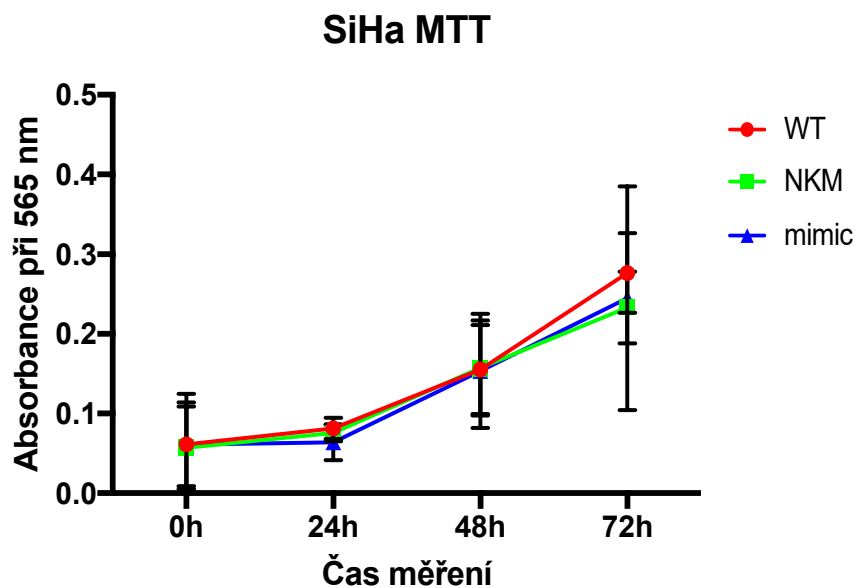
Hodnoty absorbance byly zpracovány v programu Excel a to tak, že se nejdříve vypočítal aritmetický průměr absorbance jamek, které se nacházely po obvodu destičky a které nebyly osazeny buňkami. Tento průměr byl stanoven pro každou destičku a určoval pozadí, které bylo nutno později odečíst od jednotlivých vzorků. Dále byl proveden výpočet aritmetického průměru absorbance technických replikátů jednotlivých vzorků na každé destičce, od kterého byl vždy odečten průměr absorbance pozadí specifický pro danou destičku. Takto upravená data byla zprůměrována napříč třemi biologickými replikáty a přenesena do spojnicového grafického znázornění, viz grafy 2–5.



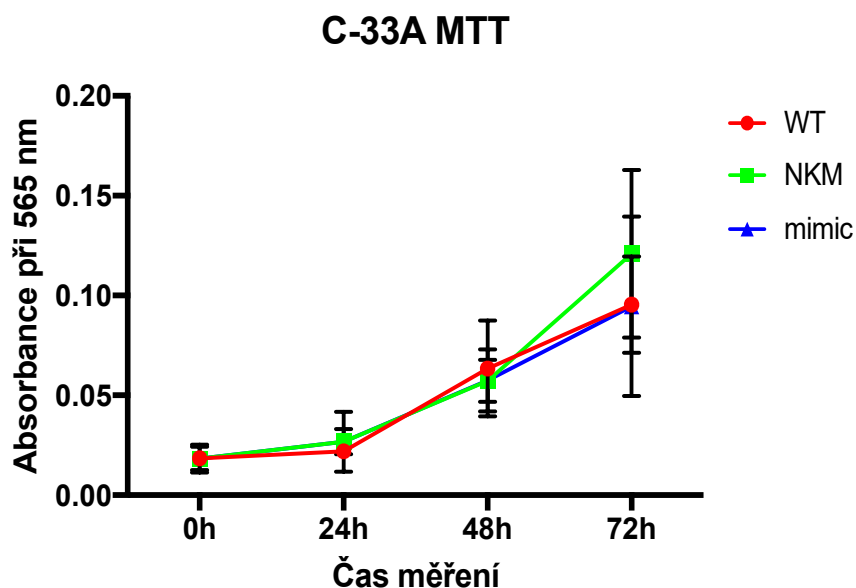
Graf 2: Grafické znázornění absorbance buněčné linie CRL-3240 v průběhu času. Absorbance odráží metabolickou a i proliferaci aktivitu. Jednotlivé křivky určují, o jaký typ ošetření buněk se jedná (WT = buňky netransfekované; NKM = buňky transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA; mimic = buňky transfekující mimikující miRNA miR-139-5p). Osa x – čas měření, osa y – hodnota absorbance při 565 nm.



Graf 3: Grafické znázornění absorbance buněčné linie FaDu v průběhu času. Absorbance odráží metabolickou a i proliferační aktivitu. Jednotlivé křivky určují, o jaký typ ošetření buněk se jedná (WT = buňky netransfekované; NKM = buňky transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA; mimic = buňky transfekující mimikující miRNA miR-139-5p). Osa x – čas měření, osa y – hodnota absorbance při 565 nm.



Graf 4: Grafické znázornění absorbance buněčné linie SiHa v průběhu času. Absorbance odráží metabolickou a i proliferační aktivitu. Jednotlivé křivky určují, o jaký typ ošetření buněk se jedná (WT = buňky netransfekované; NKM = buňky transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA; mimic = buňky transfekující mimikující miRNA miR-139-5p). Osa x – čas měření, osa y – hodnota absorbance při 565 nm.



Graf 5: Grafické znázornění absorbance buněčné linie C-33A v průběhu času. Absorbance odráží metabolickou a i proliferační aktivitu. Jednotlivé křivky určují, o jaký typ ošetření buněk se jedná (WT = buňky netransfekované; NKM = buňky transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA; mimic = buňky transfekující mimikující miRNA miR-139-5p). Osa x – čas měření, osa y – hodnota absorbance při 565 nm.

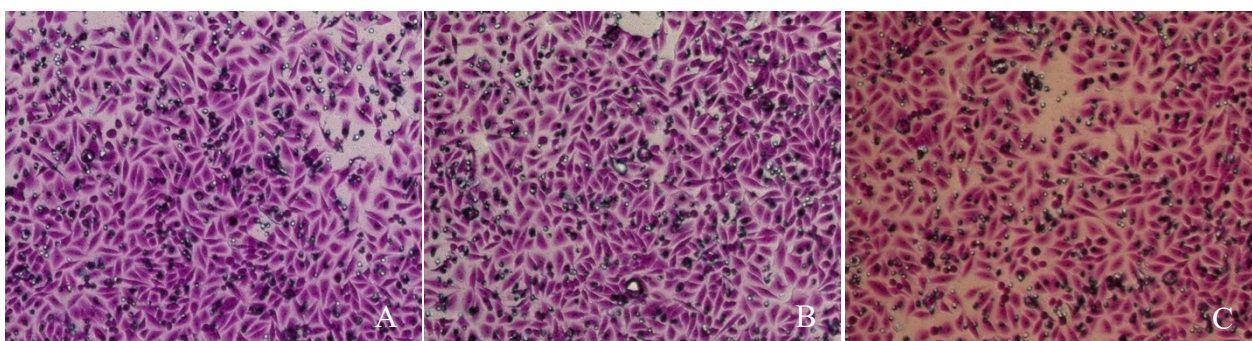
Na těchto grafech tvořených vždy třemi biologickými replikáty (grafy 2–5) lze vidět, že transfekce použitých buněčných linií pomocí mimikující miRNA miR-139-5p (označeno jako mimic) neměla žádný signifikantní dopad na změnu proliferace buněk oproti buňkám, které byly transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA (NKM) či nebyly ošetřeny nijak (WT). Transfekce mimikující miRNA miR-139-5p neměla vliv na změnu proliferace ani HPV⁺, ani HPV⁻ buněčných linií. A to i přesto, že předchozí kapitola (5.2) prokázala změnu exprese této miRNA ve všech použitých buněčných liniích. Statistické zpracování bylo provedeno pomocí ANOVA a hranice statistické signifikance byla stanovena jako hodnota p (p -value) $\leq 0,05$. Pro buněčnou linii CRL-3240 ošetřenou mimikující miRNA miR-139-5p byla hodnota $p = 0,3400$, pro linii FaDu byla hodnota $p = 0,4293$, pro linii SiHa byla hodnota $p = 0,8008$ a pro linii C-33A byla hodnota $p = 0,5554$.

5.4 Ověření změn migrace

5.4.1 Ověření změn migrace pomocí metody transwell

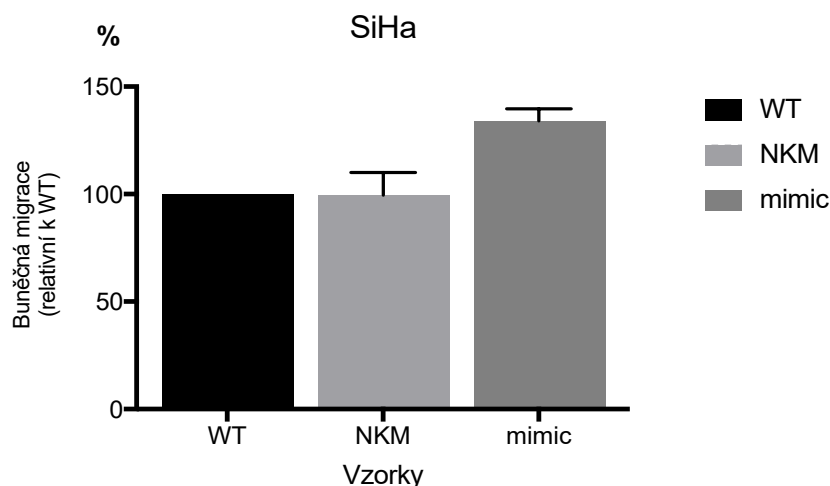
Schopnost buněčné migrace po transfekci buněčných linií (viz kapitola 4.3) pomocí mimikující miRNA miR-139-5p byla nejprve ověřena pomocí transwellové metody viz kapitola 4.5.1. Tato metoda využívá migrace přes propustný filtr. Hlavní výhodou tohoto testu je jeho detekční citlivost. Při této metodě nastala řada problémů, které nakonec vedly k ustoupení od této metody.

Všechny buněčné linie, kromě linie SiHa, rostou v klastrech a tyto klastry nebyly schopny růstu skrze póry v membráně a tedy migrovat. Výsledkem tedy byly membrány bez přerostlých buněk. Tato metoda se ukázala vhodná pouze pro buněčnou linii SiHa. U linie SiHa totiž buňky byly schopné migrace. Z důvodu vysokého množství buněk, které migrovaly přes membránu u linie SiHa, byla analýza obrazu provedena pomocí počítání intenzity pixelů. Výsledky analýzy obrazu jsou na grafu 6, detekovaná změna nebyla signifikantní a měla hodnotu $p = 0,3333$. Na obrázku 5 je porovnání mezi membránou porostlou transfekovanými buňkami SiHa a buňkami netransfekovanými.



Obrázek 5: Transwellové membrány porostlé buňkami buněčné linie SiHa, které byly transfekované mimikující miRNA miR-139-5p (A), negativní kontrolou mimikující miRNA (B), nebo byly netransfekované (C). Fotografie byly pořízeny, jak je tomu popsáno v kapitole 4.5.1. Zvětšení 100×.

Na obrázku 5 lze vidět, že na všech membránách se nachází velké množství buněk a že tedy zvýšení exprese mimikující miRNA miR-139-5p nemělo žádný signifikantní efekt na snížení schopnosti migrace. To potvrzuje i graf 6, kde je sice vidět vzrůstající trend v buněčné migraci, ale změna není signifikantní.



Graf 6: Relativní množství migrujících buněk buněčné linie SiHa. Sloupce zobrazují jednotlivé vzorky (tj. buňky transfekované miR-139-5p mimikující miRNA [mimic], negativní kontrolou mimikující miRNA [NKM], nebo buňky netransfekované [WT]) v čase 26 hod od vysazení na transwellovou kolonku. Osa x – buněčné linie; osa y – hodnota relativní buněčné migrace v procentech vzhledem k WT.

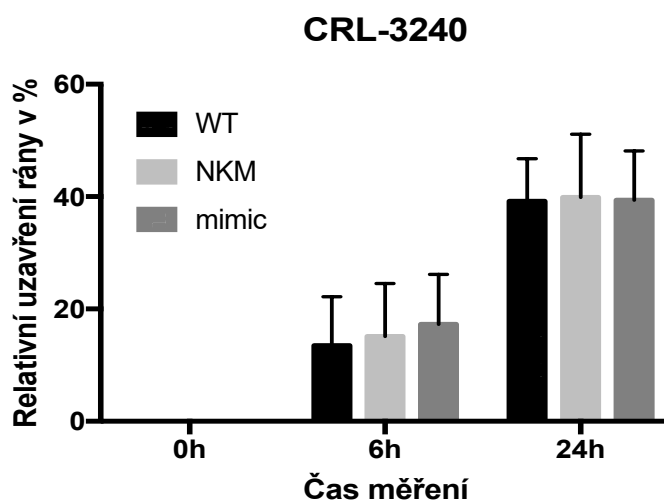
5.4.2 Ověření změn migrace pomocí metody SWHA

K prověření změn schopnosti migrace všech použitých buněčných linií se nakonec využilo metody scratch wound healing assay (SWHA), tedy metody sledování hojení rány. Použité buněčné linie byly nejprve nasazeny na 6jamkové destičky v definovaných počtech a poté byly transfekované podle popisu v kapitole 4.3. Po určité době byla provedena SWHA dle postupu popsaného v kapitole 4.5.2. Fotografie byly pořízeny vždy na pěti stejných místech dané rány v definovaných časech. Pro každou buněčnou linii byly použity biologické triplikáty, tedy kromě vzorku NKM u buněčné linie SiHa. Tento vzorek byl doplněn dodatečně a byl proveden pouze v jednom exempláři. Fotografie byly analyzovány softwarem ImageJ a to tak, že se nejprve seskupily dohromady fotografie ze stejných míst na ráně pořízené v různých časech a poté se pomocí nástroje *free-hand selection* změřil obsah rány typický pro daný čas a místo. Všechna vyfocená místa pro daný vzorek a daný čas byla průměrována na aritmetický průměr. Tím byly odfiltrovány místní odchylky ve velikosti rány. Následovalo vyhodnocení relativní velikosti rány pro každý čas a vzorek a též relativní uzavření rány pro každý čas a vzorek. Z biologických triplikátů byl proveden aritmetický průměr hodnot pro každou buněčnou linii, vzorek a čas.

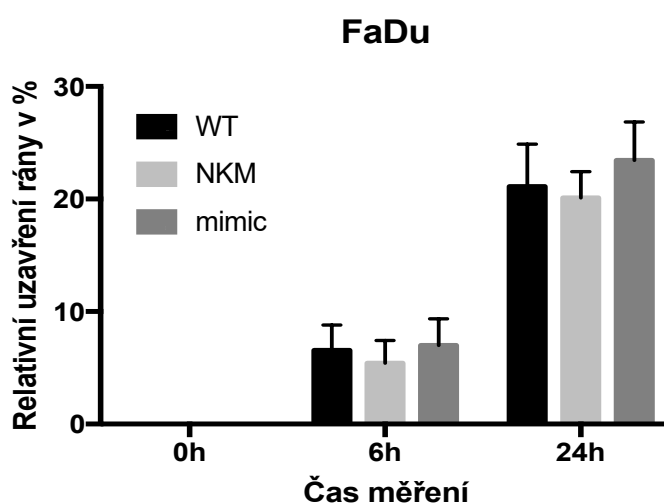
Relativní uzavření rány pro každý vzorek (tj. buňky transfekované miR-139-5p mimikující miRNA [mimic], negativní kontrolou mimikující miRNA [NKM], nebo buňky netransfekované [WT]) a každou použitou buněčnou linii v časech 0, 6 a 24 hodin zachycují grafy 7–10. Obrázky 6 a 7 ilustrují, jak vypadaly samotné rány v časech 0, 6 a 24 hodin od vytvoření rány u buněčných linií CRL-3240 a FaDu, které byly transfekované mimikující miRNA miR-139-5p

(mimic), negativní kontrolou mimikující miRNA (NKM) či byly netransfekované. Ostatní buněčné linie vypadaly obdobně.

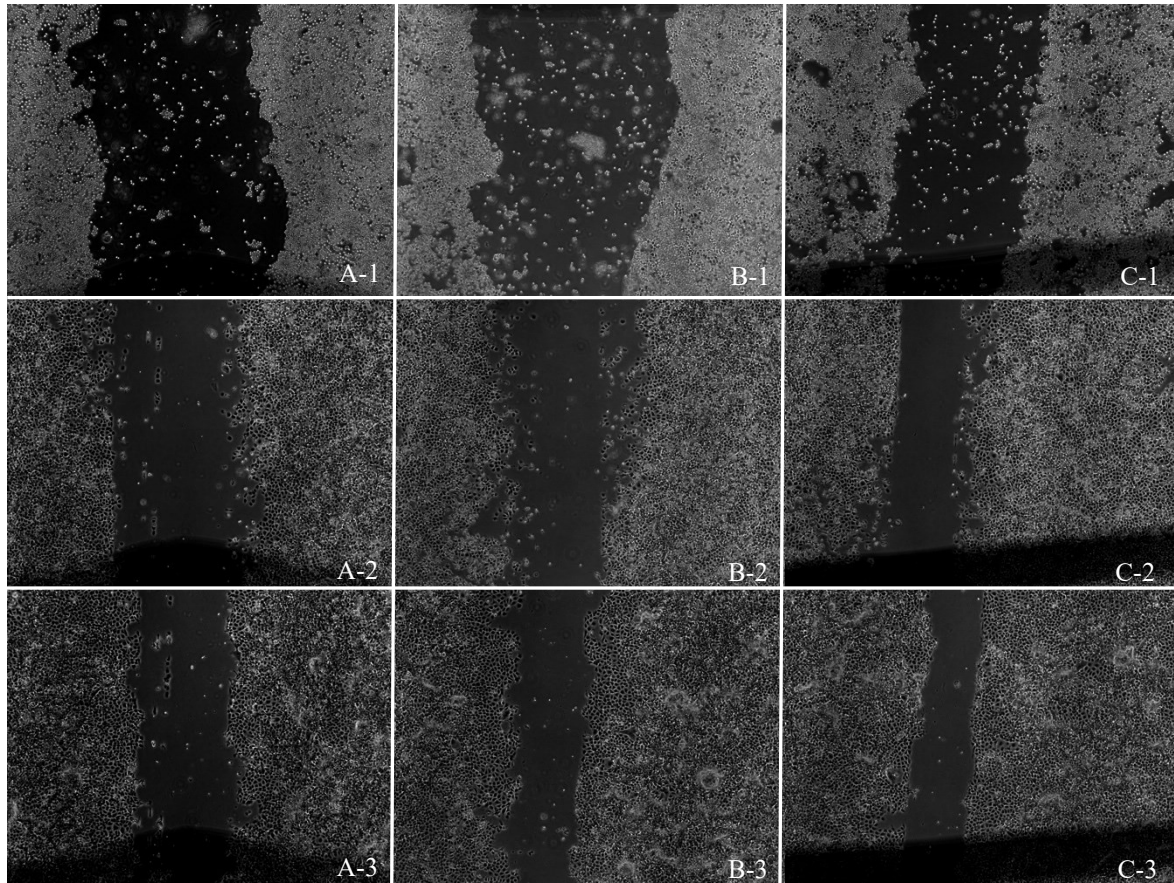
U buněčné linie CRL-3240 došlo po 24 hodinách k 39,39% relativnímu uzavření rány na vzorcích transfekovaných mimikující miR-139-5p, oproti 39,90% relativnímu uzavření rány na vzorcích transfekovaných NKM a 39,16% relativnímu uzavření rány na vzorcích netransfekovaných. Buněčná linie FaDu vykazala u vzorků transfekovaných mimikující miR-139-5p uzavření rány po 24 hodinách z 23,43 %, u vzorků transfekovaných NKM z 20,10 % a z 21,12 % u vzorků netransfekovaných.



Graf 7: Tento graf ukazuje relativní uzavření rány pro buněčnou linii CRL-3240. Sloupce zobrazují jednotlivé vzorky (tj. buňky transfekované miR-139-5p mimikující miRNA [mimic], negativní kontrolou mimikující miRNA [NKM], nebo buňky netransfekované [WT]) v časech 0, 6 a 24 hodin. Osa x – čas měření; osa – y hodnota relativního uzavření rány v procentech.

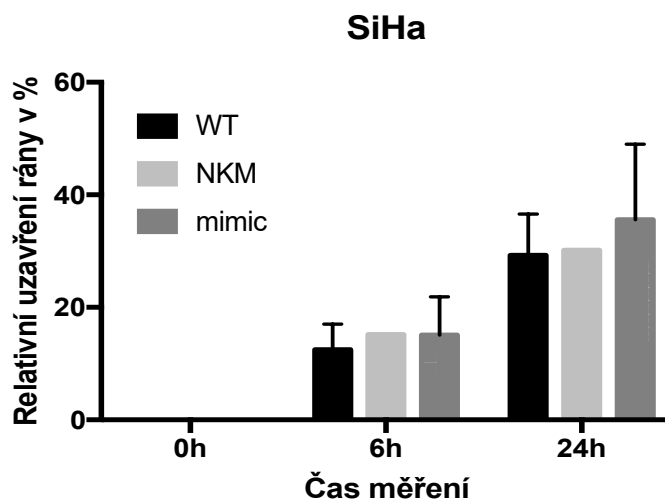


Graf 8: Tento graf ukazuje relativní uzavření rány pro buněčnou linii FaDu. Sloupce zobrazují jednotlivé vzorky (tj. buňky transfekované miR-139-5p mimikující miRNA [mimic], negativní kontrolou mimikující miRNA [NKM], nebo buňky netransfekované [WT]) v časech 0, 6 a 24 hodin. Osa x – čas měření; osa – y hodnota relativního uzavření rány v procentech.

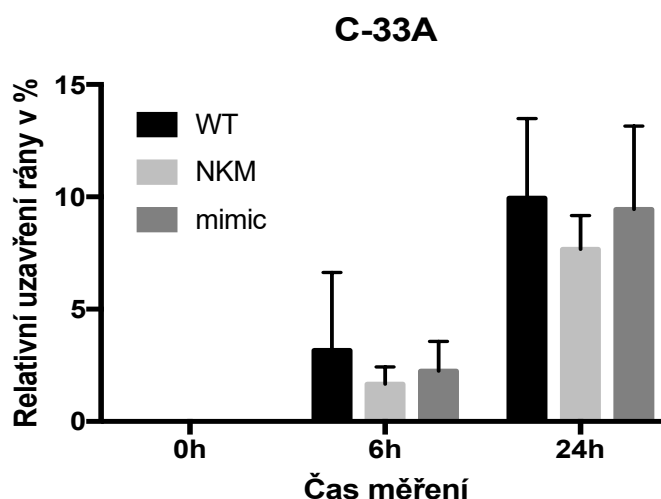


Obrázek 6: SWHA analýza provedená na buněčné linii CRL-3240. Použité buňky byly transfekované buď mimikující miR-139-5p – vzorky A, negativní kontrolou mimikující miRNA – vzorky B, anebo transfekované nebyly – vzorky C. Čísla udávají, v jakých časech byly fotografie pořízeny, kdy 1 = 0 hodin, 2 = 6 hodin a 3 = 24 hodin od vytvoření rány. Zvětšeno 40×.

U buněčné linie SiHa došlo po 24 hodinách k 35,59% relativnímu uzavření rány na vzorcích transfekovaných mimikující miR-139-5p oproti 30,19% relativnímu uzavření rány na vzorcích transfekovaných NKM a 29,26% relativnímu uzavření rány na vzorcích netransfekovaných. Buněčná linie C-33A vykázala u vzorků transfekovaných mimikující miR-139-5p uzavření rány po 24 hodinách z 9,44 %, u vzorků transfekovaných NKM z 7,67 % a z 9,94 % u vzorků netransfekovaných.

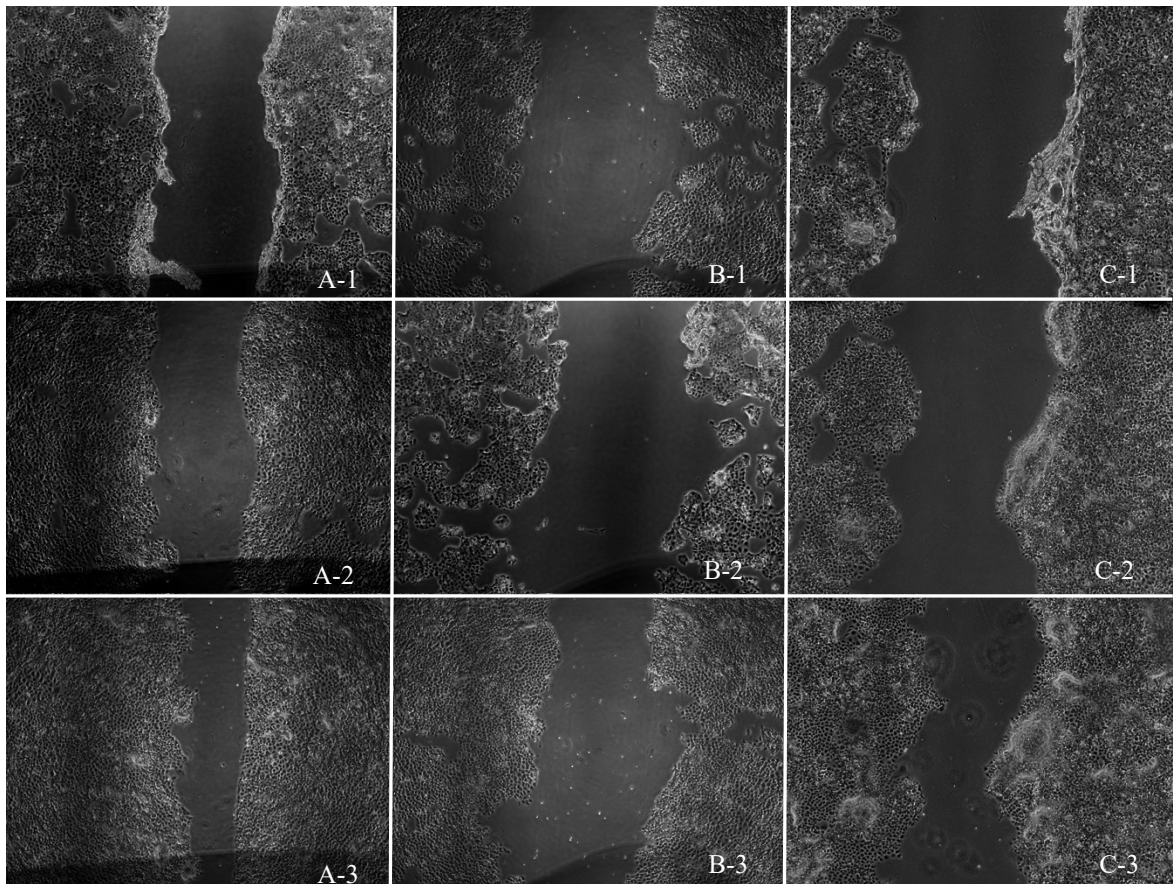


Graf 9: Tento graf ukazuje relativní uzavření rány pro buněčnou linii SiHa. Sloupce zobrazují jednotlivé vzorky (tj. buňky transfekované miR-139-5p mimikující miRNA [mimic], negativní kontrolou mimikující miRNA [NKM], nebo buňky netransfekované [WT]) v časech 0, 6 a 24 hodin. Osa x – čas měření; osa – y hodnota relativního uzavření rány v procentech.



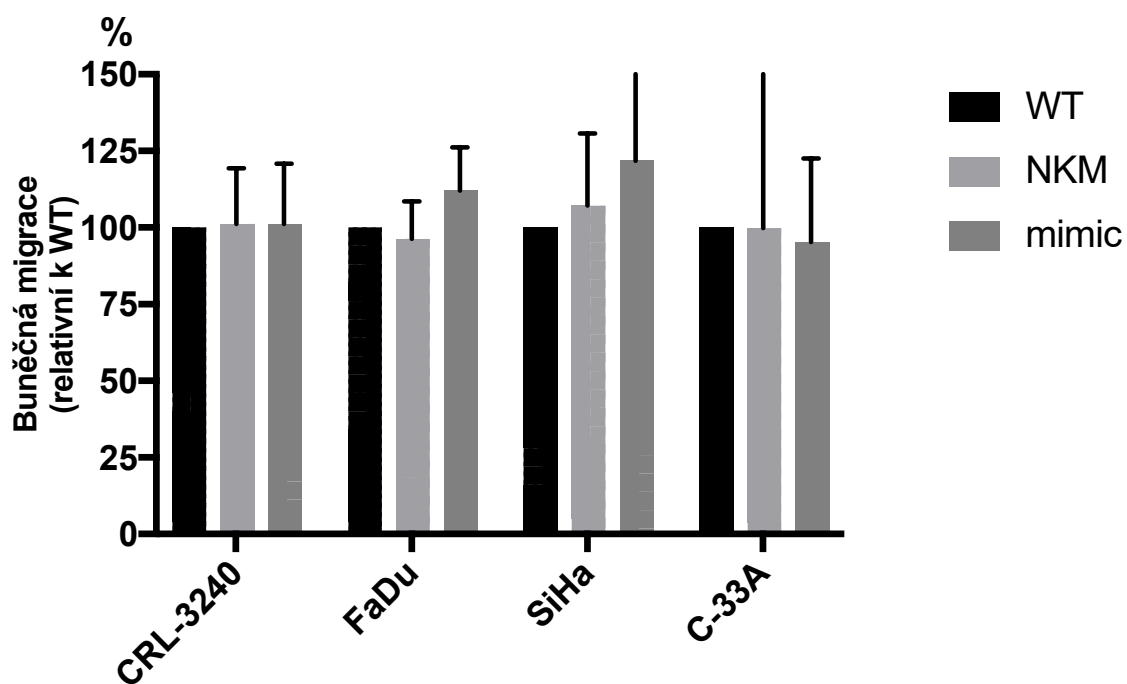
Graf 10: Tento graf ukazuje relativní uzavření rány pro buněčnou linii FaDu. Sloupce zobrazují jednotlivé vzorky (tj. buňky transfekované miR-139-5p mimikující miRNA [mimic], negativní kontrolou mimikující miRNA [NKM], nebo buňky netransfekované [WT]) v časech 0, 6 a 24 hodin. Osa x – čas měření; osa – y hodnota relativního uzavření rány v procentech.

U žádné buněčné linie, bez rozdílu na přítomnost HPV, nebyla pozorována statisticky signifikantní změna ($p \leq 0,05$) ve schopnosti buněk migrovat. Pro buněčnou linii CRL-3240 ošetřenou mimikující miRNA miR-139-5p byla hodnota $p = 0,8243$, pro linii FaDu byla hodnota $p = 0,2017$, pro linii SiHa byla hodnota $p = 0,6599$ a pro linii C-33A byla hodnota $p = 0,4996$.



Obrázek 7: SWHA analýza provedená na buněčné linii FaDu. Použité buňky byly transfekované buď mimikující miR-139-5p – vzorky A, negativní kontrolou mimikující miRNA – vzorky B, anebo transfekované nebyly – vzorky C. Čísla udávají, v jakých časech byly fotografie pořízeny kdy 1 = 0 hodin, 2 = 6 hodin a 3 = 24 hodin od vytvoření rány. Zvětšeno 40 \times .

Souhrnný graf relativního uzavření rány pro všechny buněčné linie je označen číslem 11. Data v něm odpovídají naměřeným hodnotám v čase 24 hodin a vždy jsou vztažena vzhledem k netransfekovaným buňkám (tj. WT = 100 %) odpovídající buněčné linie. Lze na něm vidět, že nedošlo k signifikantnímu potlačení schopnosti migrace buněk u žádné z použitých buněčných linií.



Graf 11: Relativní uzavření rány pro všechny buněčné linie. Sloupce zobrazují jednotlivé vzorky (tj. buňky transfekované miR-139-5p mimikující miRNA [mimic], negativní kontrolou mimikující miRNA [NKM], nebo buňky netransfekované [WT]) v čase 24 hodin od počátku měření vztažené ke vzorku WT, který má hodnotu 100 %. Osa x – buněčné linie; osa y – hodnota relativního uzavření rány v procentech vzhledem k WT.

5.5 Stanovení cílových mRNA a ověření změn jejich exprese

Zjištění cílových genů sledovaných miRNA a ověření změn jejich exprese proběhlo pomocí RT-qPCR, kdy pro ověření změny exprese cílových genů byla využita izolovaná celková RNA. Cíle sledovaných miRNA byly vybrány pomocí databází TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/) a miRDB (<http://www.mirdb.org>). Mediátorová RNA cílových genů byla v databázi TargetScan vybrána za využití nástrojů *Aggregate PCT* a *Cumulative weighted context++ score*. Tyto nástroje posloužily k seřazení a zúžení výběru cílových mRNA, kdy byly cíle vybrány na základě hodnot $\leq 0,3$ pro *Aggregate PCT* a $\leq 0,3$ pro *Cumulative weighted context++ score*. V databázi miRDB byly mRNA cílových genů seřazeny dle cílového skóre ≥ 90 . Na základě těchto parametrů po sloučení výsledků databází a s ohledem na roli v buněčné proliferaci byly vybrány jako kandidátní cíle miR-139-5p mRNA genů: *FOS*, *JUN*, *KIF13A* a *GDF10*.

Nejprve byla vytvořena cDNA pomocí reverzní transkriptázy a mixu primerů v podobě náhodných hexamerů a oligo (dT) dodávaných jako součást iScript cDNA synthesis kitu. Detailní způsob tvorby cDNA je popsán v kapitole 4.8. Následovalo qPCR se specifickými primery pro každou mRNA (tabulka 7) pro vzorky z každé buněčné linie. Popis qPCR pro ověření změn exprese cílových genů je detailněji popsán kapitolou 4.8. Jako vzorky byla použita 3× ředěná cDNA buněk transfekovaných mimikující miRNA miR-139-5p a negativní kontrola mimikující miRNA (NKM).

Pro každý použitý primer u dané buněčné linie byla na vzorku NKM stanovena pětibodová standardní křivka, která byla vytvořena stejným postupem jako je to popsáno v kapitole 4.7. Jednotlivá ředění byla pipetována vždy v triplicátech. Na základě standardních křivek byly stanoveny hodnoty prahu detekce a efektivity amplifikace. Hodnoty prahu detekce a efektivity amplifikací, které byly získány pro jednotlivé buněčné linie, a použité primery jsou zobrazeny v tabulce 12. RT-qPCR zahrnovalo jak kontroly čistoty práce při RT-PCR a qPCR, tak i kontrolu pro DNA kontaminaci vzorků. Všechny kontroly vyšly negativně. Reakce pro qPCR s primery pro mRNA genu *GDF10* se nepodařilo optimalizovat pro žádnou buněčnou linii, a proto byl tento gen vyřazen z analýzy.

Buněčná linie	Primer pro daný gen	Hodnota prahu detekce	Efektivita
CRL-3240	<i>JUN</i>	0,0120	0,69
	<i>FOS</i>	0,0660	0,78
	<i>KIF13A</i>	0,0436	0,78
	<i>HPRT</i>	0,0096	0,77
SiHa	<i>JUN</i>	0,0112	0,99
	<i>FOS</i>	0,0084	1,06
	<i>KIF13A</i>	0,0072	0,76
	<i>HPRT</i>	0,0096	0,69
FaDu	<i>JUN</i>	0,0104	0,81
	<i>FOS</i>	0,0136	0,75
	<i>KIF13A</i>	0,0128	0,87
	<i>HPRT</i>	0,0080	0,81
C-33A	<i>JUN</i>	0,0156	0,79
	<i>FOS</i>	0,0096	0,96
	<i>KIF13A</i>	0,1092	0,72
	<i>HPRT</i>	0,0454	0,76

Tabulka 12: Hodnoty prahu detekce a efektivit amplifikací, které byly získány pro jednotlivé buněčné linie a použité primery.

Hodnoty Ct pro příslušné vzorky dvou nezávislých transfekcí v triplikátech jsou zobrazeny v tabulce 13 a byly určeny přiřazením hodnoty prahu detekce získané z pětibodové ředící řady k výsledným křivkám příslušných vzorků. Ct hodnoty byly vloženy do programu GenEx a analýza pokračovala stejným způsobem, jako tomu bylo v případě ověření změny exprese miRNA, viz kapitola 5.2. Přehled $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2) hodnot, tedy hodnot změny exprese (FC), je zobrazen v tabulce 14. Kladné hodnoty znamenají zvýšení exprese sledovaného genu, zatímco záporné hodnoty znamenají snížení exprese tohoto genu v dané buněčné linii v porovnání s kontrolami stejných buněčných linií, které byly transfekované NKM.

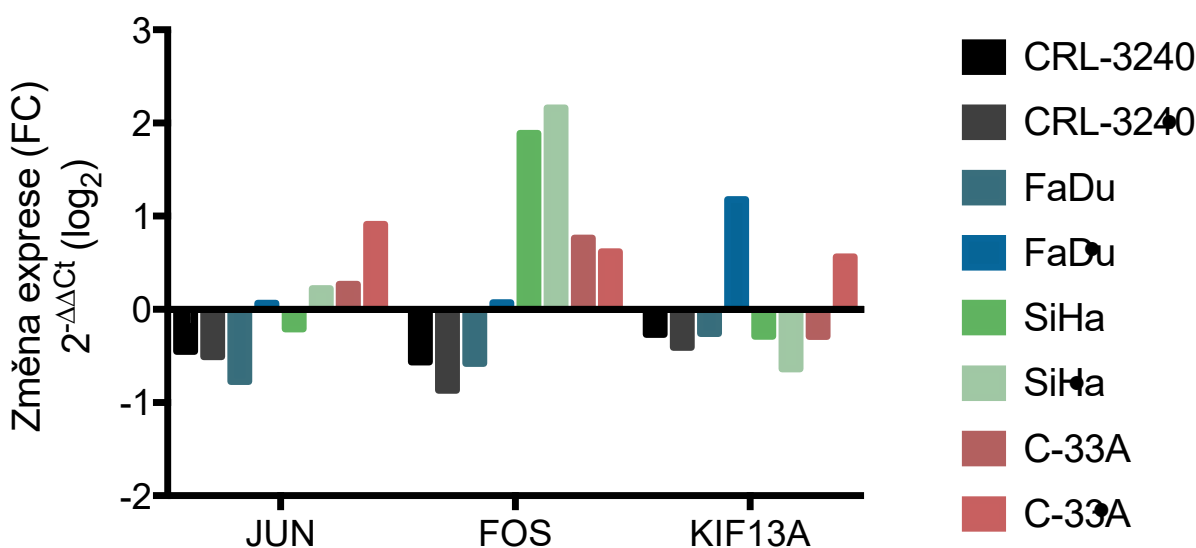
Vzorek	Ct JUN	Ct FOS	Ct KIF13A	Ct HPRT
CRL-3240_NKM	15,05	15,69	18,35	12,52
	15,14	15,59	18,35	12,53
	14,96	15,81	18,35	12,11
CRL-3240_139	15,15	16,00	18,31	12,04
	15,28	16,02	18,18	12,11
	15,23	15,94	18,37	11,84
CRL-3240_NKM●	15,46	16,67	19,24	12,79
	15,31	16,66	19,16	12,82
	15,34	16,61	19,21	12,69
CRL-3240_139●	15,95	17,54	19,64	12,57
	15,61	17,44	19,45	12,61
	16,01	17,59	19,49	12,62
FaDu_NKM	12,84	11,07	17,00	12,60
	12,84	11,29	16,89	12,80
	13,11	11,47	17,05	12,59
FaDu_139	13,87	12,06	17,45	12,68
	13,82	11,90	17,09	12,72
	13,77	11,98	17,22	12,55
FaDu_NKM●	14,52	15,33	16,94	12,38
	14,52	15,54	17,20	12,43
	15,10	15,47	17,26	12,50
FaDu_139●	15,48	16,13	16,59	13,30
	15,42	16,20	16,50	13,38
	15,44	16,32	16,70	13,06
SiHa_NKM	17,08	16,86	17,81	13,82
	17,14	16,49	17,92	14,00
	17,35	16,86	17,73	14,08
SiHa_139	17,28	14,82	17,99	13,96
	17,13	14,85	17,94	13,86
	17,19	14,53	17,86	13,29
SiHa_NKM ●	16,87	16,03	16,58	14,23
	16,84	15,92	16,69	14,06
	16,84	16,03	16,79	14,28
SiHa_139●	16,45	14,03	17,63	14,29
	16,77	13,82	17,65	14,03
	16,67	13,93	17,14	14,27
C-33A_NKM	16,33	17,70	22,33	15,05
	16,51	17,71	22,33	14,87
	16,41	17,71	22,35	15,02
C-33A_139	16,12	17,02	22,94	15,04
	16,35	16,91	22,80	15,10
	16,06	17,04	22,65	15,05
C-33A_NKM●	16,73	17,08	22,97	15,01
	16,64	17,17	22,93	15,07
	16,67	17,11	23,02	15,05
C-33A_139●	16,43	16,91	23,02	15,83
	16,18	17,25	22,88	15,76
	16,18	17,03	23,01	15,61

Tabulka 13: Ct hodnoty triplikátů vzorků použitých pro analýzu změny exprese mRNA genů, jež jsou kandidátními cíli miR-139-5p. Použitá cDNA z příslušných buněčných linií byla 3× ředěná. NKM značí, že buňky dané buněčné linie byly transfekované negativní kontrolou mimikující miRNA; 139 značí, že buňky dané buněčné linie byly transfekované mimikující miRNA miR-139-5p. Symbol ● značí biologický duplikát.

Vzorek	JUN	FOS	KIF13A
CRL-3240_139	-0,4500	-0,5625	-0,2686
CRL-3240_139●	-0,5057	-0,8666	-0,4063
FaDu_139	-0,7732	-0,5793	-0,2582
FaDu_139●	0,0656	0,0717	1,1780
SiHa_139	-0,2093	1,8894	-0,2891
SiHa_139●	0,2235	2,1616	-0,6379
C-33A_139	0,2696	0,7637	-0,2919
C-33A_139●	0,9127	0,6178	0,5654

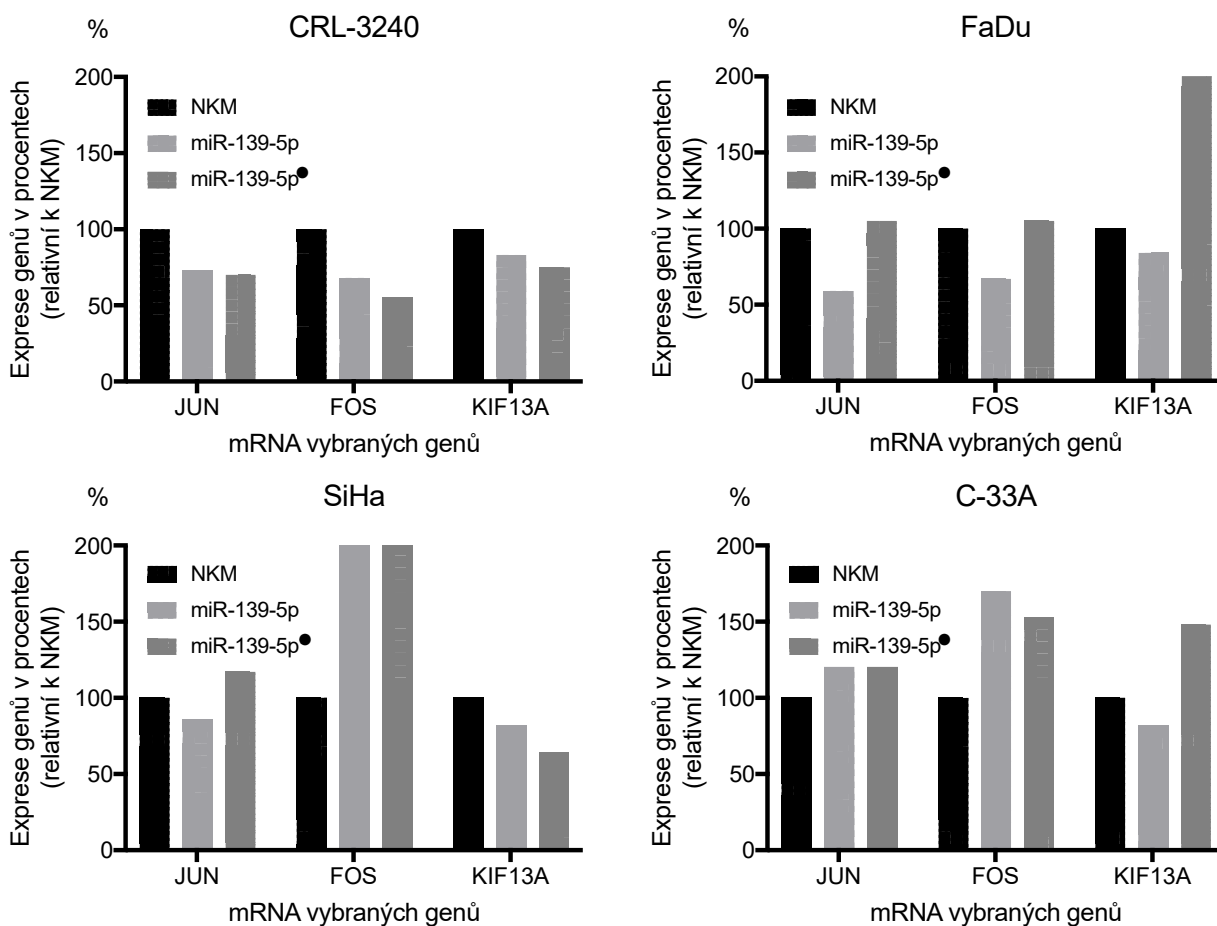
Tabulka 14: Přehled $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2) hodnot kandidátních genů, které jsou potenciálním cílem mimikující miRNA miR-139-5p. Symbol ● značí biologický duplikát. Kladné hodnoty znamenají zvýšení exprese sledovaného genu, zatímco záporné hodnoty znamenají snížení exprese tohoto genu v dané buněčné linii v porovnání s kontrolami stejných buněčných linií, které byly transfekované NKM.

Grafický přehled tabulky 14, tedy přehled změn exprese vybraných genů na úrovni mRNA, je označen jako graf 12. Biologické duplikáty jsou označeny symbolem ●.



Graf 12: Přehled změn $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2) hodnot mRNA kandidátních genů, které jsou potenciálním cílem mimikující miRNA miR-139-5p. Osa x – kandidátní geny, osa y – změna exprese (FC, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (\log_2)). Kladné hodnoty znamenají zvýšení exprese sledovaného genu, zatímco záporné hodnoty znamenají snížení exprese tohoto genu v dané buněčné linii.

Změna exprese vybraných genů na úrovni mRNA je též zobrazena na grafu 13a–d. Na tomto grafu je vidět relativní změna exprese ve studovaných vzorcích vztažená ok vzorkům transfekovaným NKM (tj. NKM = 100 %). Změna exprese vůči NKM je vyjádřena v procentech. Data v tomto grafického znázornění odpovídají hodnotám $2^{-\Delta\Delta Ct}$ kandidátních genů z tabulky 14.



Graf 13: Změna exprese mRNA kandidátních genů v použitých buněčných liniích: A) CRL-3240, B) FaDu, C) SiHa, D) C-33A. Relativní změna exprese ve studovaných vzorcích vztažená vzhledem k vzorkům transfekovaným negativní kontrolou mimikující miRNA (tj. NKM = 100 %). Ve sloupcích označených miR-139-5p jsou hodnoty exprese genů pro buněčné linie transfekované miR-139-5p mimikující miRNA. Symbol • značí biologický duplikát.

6 Diskuse

Nádory hlavy a krku jsou skupinou heterogenních, etiologicky velmi různorodých nádorů. Hlavními rizikovými faktory spojenými se vznikem těchto nádorů je konzumace alkoholu a tabákových výrobků. Mezi další rizikové faktory patří infekce HPV, jež na základě studie CDC způsobuje až 70 % nádorů orofaryngu (CDC, 2021; Viens et al., 2019). Mezi nádory hlavy a krku se řadí orofaryngeální spinocelulární karcinom (OPSCC), který zahrnuje karcinomy tonzil, spodiny jazyka, měkkého patra a uvuly. Právě orofaryngeální nádory, jejichž příčinou je infekce HPV, jsou na vzestupu v některých rozvinutých zemích, kde zároveň klesá konzumace tabákových výrobků a alkoholu (Carlander et al., 2021).

Vhodný diagnostický marker specifický pro daný nádor a provádění preventivního screeningu jsou důležitými nástroji pro diagnostiku nádorů, jejíž včasné provedení zlepšuje prognózu léčby. Preventivní screening se provádí u cervikálního karcinomu, který je téměř ve 100 % způsoben infekcí HPV. Hlavní metodou je cytologické vyšetření stěru z hrdla děložního,

kteřé je doporučeno provádět u žen kařký rok, a kteřé je schopné identifikovat již prekancerózní stádia onemocnění. Prekancerózní léze odhalené pomocí screeningu jsou snáze léčitelné a rakovině tak lze předejít. V případě odhalení karcinomu v rané fázi prostřednictvím screeningu je u pacientů vysoký potenciál vyléčeni (WHO, n.d.). Screening zahrnuje také testování na HPV infekci u žen ve věku 35 a 45 let. Takový preventivní screening se u OPSCC neprovádí, přitom HPV⁺ OPSCC nádory se liší od HPV⁻ OPSCC nádorů v etiologii i v přežívání, kdy pacienti s HPV⁺ nádory vykazují lepší reakci na léčbu a vyšší míru přežití než pacienti HPV⁻ nádory. Důvodem neexistence screeningu u OPSCC je absence vhodného diagnostického markeru pro běžné klinické vyšetření, který by identifikoval raná stádia onemocnění. To vede k pozdější diagnóze OPSCC, kdy je již rakovina rozvinuta. Pro nádory orofaryngu také platí, že diagnóze karcinomu nepředchází výskyt klinicky detekovatelných prekancerózních lézí jako je tomu u karcinomu hrdla děložního (Hashim et al., 2019).

Takovým diagnostickým markerem by mohly být miRNA. Nejenže jsou velmi stabilní i za nefyziologických podmínek, také se vyskytují i vně buněk jako extracelulární cirkulující miRNA. Právě cirkulující miRNA, jeř jsou uvolňovány do tělních tekutin včetně krve a mozkomíšního moku, mají potenciál sloužit jako biomarkery u řady onemocnění. Jejich stabilita, snadné získávání a detekce jsou důležitými faktory pro využití jako biomarkery (Filipów & Łaczmański, 2019).

Nádory vykazují aberantní expresi miRNA, která může přispívat k nádorové progresi (Y. Peng & Croce, 2016). Protože různé typy nádorů jsou spojovány s různou aberantní expresí miRNA, záleží rovněž na typu tkáně a jejím nádorovém charakteru (Tomaszewska et al., 2021). Několik výzkumných skupin se zaměřilo na studium expresního profilu miRNA v HPV⁺ orofaryngeálních nádorech s cílem definovat specifické diferenciólně deregulované miRNA (Bořinović et al., 2019; Lajer et al., 2012; Nunvar et al., 2021; Vojtechova et al., 2016). Byly identifikovány miRNA, které jsou diferenciólně exprimované v HPV⁺ nádorech orofaryngu oproti zdravé tkáni i oproti HPV⁻ orofaryngeálním nádorům. Úloha jednotlivých diferenciólně exprimovaných miRNA v těchto nádorech není dosud známa (Nunvar et al., 2021; Vojtechova et al., 2016).

Před samotným zahájením experimentální části diplomové práce byla prostudována relevantní literatura pro získání informací o roli celkem 21 miRNA v malignitách, a to včetně malignit asociovaných s HPV. Tyto miRNA byly vybrány na základě dříve uveřejněné studie Nunváře a kolegů (Nunvar et al., 2021) a diplomové práce Mgr. Lucie Pagáčové (Pagáčová, 2020). Studium dostupné literatury umožnilo získané informace zpracovat do přehledové tabulky (přiloha 1), která shrnuje role a známé cíle těchto miRNA v rámci různých malignit. Tato

tabulka byla aktuální k datu 21. 11. 2020 a studie uveřejněné po tomto datu v ní nejsou zaneseny.

Pro funkční analýzu byla vybrána miR-139-5p, u které byla pozorována snížená exprese u HPV⁺ OPSCC klinických vzorků oproti zdravé tkáni stejné lokalizace (Nunvar et al., 2021). Na základě studií provedených na buněčných kulturách, odvozených z mnoha typů malignit včetně hepatocelulárního karcinomu (MHCC97H), karcinomu slinivky (SW1990), HPV⁺ cervikálního karcinomu (SiHa) a HPV⁻ OPSCC (CAL-27), má miR 139-5p tumor supresivní účinek (Ji et al., 2019; Ma et al., 2018; K. Wang et al., 2017; Y. Zhang et al., 2022). Ve zmíněných studiích provedených u buněčných kultur odvozených od daného nádoru byla pozorována snížená exprese miR-139-5p v porovnání s odpovídajícími zdravými primárními buňkami.

Druhá miRNA zvolená pro funkční analýzu, miR-147b, byla vybrána na základě její zvýšené exprese v klinických HPV⁺ OPSCC vzorcích v porovnání se zdravou tkání (Nunvar et al., 2021). Funkční studie provedené na buněčných kulturách ukazují, že miR-147b má duální charakter. Tedy že v některých nádorových buněčných liniích funguje jako tumor supresivní, zatímco v jiných zase jako oncomiR (E. Zhang et al., 2017; Y. Zhang et al., 2016). Tumor supresivní charakter má miR-147b v buněčné linii odvozené od rakoviny prsu (MDA-MB-231), u které je její exprese oproti zdravým buňkám stejné lokalizace snížena. Zvýšení exprese miR-147b v této buněčné linii vedlo ke snížení proliferačních, invazivních a migračních schopností (Y. Zhang et al., 2016). Oproti tomu v buněčných liniích odvozených od hepatocelulárního karcinomu (HepG2, Huh7) má miR-147b charakter oncomiR. Tyto buněčné linie vykazují zvýšenou expresi miR-147b oproti zdravým buňkám stejné lokalizace, přičemž inhibice exprese miR-147b v použitých liniích vedla ke snížení schopnosti proliferace a migrace (E. Zhang et al., 2017).

V této diplomové práci byla studována role miR-139-5p nejprve na HPV⁺ (CRL-3240) a HPV⁻ (FaDu) hypofaryngálních a posléze i na HPV⁺ (SiHa) a HPV⁻ (C-33A) cervikálních epiteliálních buněčných liniích. S přihlédnutím k předchozím publikovaným studiím byl předpoklad, že miR-139-5p má v těchto buněčných liniích tumor supresivní charakter a sníženou expresi. Zvýšení exprese miR-139-5p pomocí transfekce buněk mimikující pre-miR-139-5p by proto u použitých buněčných linií vedlo ke snížení schopnosti proliferovat a migrovat. Pro studium buněčné proliferace jsme využili metody MTT a pro studium buněčné migrace metodu SWHA. Protože u transfekovaných buněk nebyla pozorována změna v migračních a proliferačních schopnostech buněk, byly do studie následně zahrnuty i cervikální buněčné linie. Tím jsme se pokusili zjistit, zda efekt zvýšení exprese miR-139-5p je charakteristický pouze pro hypofaryngální buněčné linie.

V první fázi práce bylo nutné optimalizovat látkové množství mimikující miRNA. V případě buněčné linie CRL-3240 byla optimalizace provedena již v diplomové práci Mgr. Lucie Pagáčové (Pagáčová, 2020). V článkách zabývajících se studiem funkce miRNA-139-5p velmi často informace o použitém látkovém množství mimikující miRNA uvedeny nejsou, nebo jsou uvedeny neúměrně vysoké hodnoty (Ji et al., 2019; K. Wang et al., 2017). Byla proto v této práci vyzkoušena řada látkových množství (5–60 pmol) pro každou buněčnou linii. Finální množství mimikující miRNA, které bylo použito pro další experimentální práci, bylo vybráno na základě pozorování změny exprese miRNA v buněčných liniích. U každé buněčné linie bylo použito stejné látkové množství kontrolní mimikující miRNA.

Transfekce buněk miR139-5p ve zvolených látkových množstvích vedla k výraznému zvýšení její exprese ve všech buněčných liniích oproti kontrolám. Úspěšné zvýšení exprese miR-139-5p v buněčných liniích je v souladu s výsledky (Pagáčová, 2020), která pomocí mimikující miRNA úspěšně zvýšila expresi miR-139-5p u buněčné linie CRL-3240, a s výsledky skupiny (Ji et al., 2019), kteří úspěšně zvýšili expresi této miRNA u buněčné linie SiHa.

Po zvýšení exprese dané miRNA jsme u ošetřených buněk sledovali schopnost migrace a porovnávali ji s kontrolami. Ke studiu proliferace buněk byla použita metoda MTT, která odráží proliferační schopnost buněk na základě jejich metabolické aktivity (*MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation*, n.d.). Z důvodu různé rychlosti proliferace mezi jednotlivými buněčnými liniemi bylo nejprve nutné optimalizovat množství nasazených buněk. Pro optimalizaci byly proto nasazeny netransfekované buňky v různých počtech od 1 do 10 tisíc na jamku a sledovala se jejich proliferační aktivita. Jako optimální množství buněk nasazených na jamku bylo zvoleno 5 tisíc buněk pro všechny buněčné linie. Toto množství odpovídá běžně používanému množství pro tento typ analýzy (Ge et al., 2019; Y. Li et al., 2022; Qu et al., 2017; K. Wang et al., 2017).

Výsledky MTT testů provedených u všech buněčných linií v biologických triplikátech ukázaly, že mezi jednotlivými vzorky není statisticky signifikantní ($p \leq 0,05$) rozdíl v proliferaci. Z toho vyplývá, že miR-139-5p nemá v tomto případě inhibiční účinek na proliferaci. Rozdílné výsledky v této práci a u jiných studií, co se týče inhibice miR-139-5p na buněčnou proliferaci, mohou spočívat v použití různých typů buněčných linií. V žádné z uvedených studií sledujících efekt miR-139-5p na buněčnou proliferaci a využívajících rovněž MTT metodu k detekci nepoužili autoři stejné buněčné linie, které byly použity v této práci (Y. Li et al., 2022; K. Wang et al., 2017; Z. Zhang et al., 2020). Konkrétně byly použity buněčné linie odvozené od karcinomu plic (A549, H1299) (Z. Zhang et al., 2020), karcinomu žaludku (HGC-26) (Y. Li et al., 2022;) a OPSCC (SAS, CAL-27) (K. Wang et al., 2017). V posledním uvedeném případě byly

použity HPV⁻ buňky původem z báze jazyka. Ve všech uvedených studiích byla změna v proliferčních schopnostech buněk vyhodnocena jako statisticky signifikantní ($p < 0,01$).

Současně byla ověřována i další důležitá vlastnost nádorových buněk, tedy schopnost jejich migrace. To bylo provedeno nejprve na základě metody transwell a posléze pomocí metody SWHA. Jelikož metoda transwell neovlivňuje oproti metodě SWHA rychlost proliferace buněk, je proto považována za přesnější metodu pro studium buněčné migrace. Metoda SWHA je však běžně užívaná metoda ke stanovení polaritě a rychlosti migrace buněk (Kovaříková et al., 2014).

Kvůli charakteru většiny použitých buněčných linií s výjimkou linie SiHa se metoda transwell ukázala jako nevhodná pro účely této práce. Buněčné linie CRL-3240, FaDu a C-33A rostou v klastrech a samotné buňky nejsou schopny migrovat skrze póry v membráně transwellové kolony. U buněčné linie SiHa byl pozorován trend zvýšené migrace transfekovaných buněk oproti kontrolám, nicméně tato zvýšená migrace nebyla statisticky signifikantní.

Změny v buněčné migraci byly u všech buněčných linií prověřeny a zhodnoceny pomocí metody SWHA. U buněčné linie SiHa byl opět pozorován trend zvýšené migrace transfekovaných buněk v porovnání s kontrolami. Stejný trend v menší míře lze pozorovat i u buněčné linie FaDu. U ostatních linií (CRL-3240 a C-33A) nebyl pozorován žádný trend ve změně migračních schopností. U žádné buněčné linie nedošlo k statisticky signifikantní změně v migraci.

Výsledky získané pomocí SWHA metody a podpořené rovněž výsledky metody transwell jsou u buněčné linie SiHa v rozporu s článkem publikovaným Ji a kolegy. V tomto článku je uvedeno, že miR-139-5p po transfekci do buněk snižuje schopnost jejich proliferace a migrace (Ji et al., 2019). V této studii byly pro testování proliferčních schopností buněk zvoleny odlišné metody (souprava pro počítání buněk 8 [CCK-8] a 5-ethynyl-2'-deoxyuridin [EdU]). Princip obou metod (CCK-8 a MTT) je založen na kolorimetrickém testu. Nicméně u metody CCK-8 se optická hustota měří při kratší vlnové délce (OD 450 nm) než u metody MTT (OD 565 nm), což se odvíjí od emisního spektra použité chemikálie. Na rozdíl od metody MTT použité v této práci byla pomocí metody CCK-8 sledována proliferace pouze ve třech po sobě jdoucích dnech. V našem případě byla sledována čtyři dny. Metoda EdU počítá buňky podle inkorporace fluorescenčního barviva a jejím výstupem je absolutní počet buněk. Oproti tomu výstupem metody MTT je již zmíněná optická hustota. Pro testování migračních schopností bylo stejně jako ve studii Ji et al., 2019 využito metody transwell. Nicméně ve zmiňované studii bylo použito téměř 4× vyšší množství buněk (3×10^5) než v této práci (8×10^4) (Ji et al., 2019). Studie také neuvádí informaci o látkovém množství mimikující miRNA, které bylo pro transfekci použito. Námi získaná data pro buněčnou linii SiHa ukazují, že k inhibici migrace nedošlo

tak, jako ve zmiňovaném článku. Je proto možné, že bylo využito řádově vyšší látkové množství mimikující miRNA, které již mělo inhibiční účinky na proliferaci i migraci buněk. Zůstává však otázkou, zda řádově vyšší látkové množství skutečně vede ke specifické inhibici proliferačních a migračních schopností buněk, nebo k nespecifické inhibici tím, že cílí buď na mRNA, které nejsou primárním cílem, nebo tím, že zahltí aparát biogeneze miRNA (Singh et al., 2011). V neposlední řadě stojí za zmínku, že buňky stejných nádorových buněčných linií mohou být velmi heterogenní a mohou se mezi sebou lišit (Shen et al., 2020). I to může mít dopad na rozdílné výsledky této práce a článku Ji et al., 2019.

Určení cílového genu miR-139-5p, respektive mRNA cílového genu, bylo provedeno na základě dvou různých databází TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/) a miRDB (<http://www.mirdb.org>). Databáze TargetScan předpovídá biologické cíle miRNA hledáním přítomnosti konzervovaných osmimerních, sedmimerních a šestimerních míst, které odpovídají centrální (tzv. *seed*) oblasti každé miRNA (Lewis et al., 2005). Databáze miRDB předpovídá biologické cíle miRNA stanovením cílového skóre na základě přítomnosti konzervovaných osmimerních a sedmimerních míst v 3' UTR oblasti mRNA. Pokud je v jedné mRNA přítomno více takovýchto míst, jsou tato místa zkombinována. Cílové skóre je poté vypočítáno dle vzorce: $S = 100 \times (1 - \prod_{i=1}^n p_i)$, kde n představuje počet kandidátních cílových míst v 3' UTR a p_i představuje statistickou významnost p -hodnoty pro každé z těchto kandidátních míst (X. Wang & el Naqa, 2008). Každá databáze predikující cílové mRNA pro miRNA tedy pracuje na základě jiných algoritmů, proto často ukazují jiné výsledky, což se následně odráží i v publikacích, kde se objevují různé cílové mRNA (J. Wu et al., 2020; Y. Zhang et al., 2022). Předpokládali jsme, že spojením výsledků vygenerovaných z obou zmíněných databází získáme takové cílové mRNA, které jsou zastoupeny v obou databázích a tím zvýšíme pravděpodobnost správného cíle. Cílové mRNA byly vybrány na základě parametrů jako je hodnota $\leq 0,3$ pro *Aggregate PCT* a $\leq 0,3$ pro *Cumulative weighted context++ score* v databázi TargetScan a cílové skóre ≥ 90 v databázi miRDB. Na základě těchto parametrů se po sloučení výsledků vybraly jako kandidátní cíle mRNA odpovídající *FOS*, *JUN*, *KIF13A* a *GDF10* genům. Tyto mRNA byly rovněž vybrány na základě jejich role v buněčném cyklu.

Gen *FOS* je gen tzv. rané odpovědi (*early response gene*) a jím kódovaný protein je důležitý transkripční faktor v eukaryotických buňkách. Mezi funkce FOS patří mimo jiné indukce transkripce genů (např. pro cyklin D1), které mají přímý vliv na buněčnou proliferaci (Brown et al., 1998; Q. Wang et al., 2017). Proteinový produkt genu *JUN* pozitivně reguluje buněčnou proliferaci tím, že indukuje transkripci genu pro cyklin D. Proteinový produkt cyk-

linu D poté blokuje funkci tumor supresorového proteinu pRb jeho fosforylací, což má za následek uvolnění transkripčního faktoru E2F a přechod z G do S fáze buněčného cyklu (Shaulian & Karin, 2001). Podobně jako protein JUN funguje i virový protein E7 u HPV, který také zprostředkovává vstup do buněčného cyklu fosforylací proteinu pRb (Dyson et al., 1989). Protein KIF13A je produktem stejnojmenného genu a v cytokinezi je nezbytný pro translokaci proteinů FYVE-CENT a TTC19 z centrosomu do kontraktálního prstence důležitého pro rozdělení buněk. Ztráta funkce tohoto proteinu vede k zastavení cytokineze buněk (Sagona et al., 2010). Tento protein se též účastní váčkového transportu z Golgiho aparátu na buněčnou membránu a ovlivňuje expresi a distribuci manóza-6-fosfátového receptoru u buněk (Nakagawa et al., 2000). Ghosh a kolektiv ve své práci uvádějí, že manóza-6-fosfátový receptor se účastní regulace růstu buněk (Ghosh et al., 2003). Poslední vybraný gen, *GDF10*, je gen pro růstový diferenciální faktor 10. Bylo prokázáno, že proteinový produkt tohoto genu má vliv na proliferaci a migraci buněk odvozených z karcinomu nasofaryngu, z karcinomu prsu a z OSCC. Snížení jeho exprese vede ke zvýšené proliferaci buněk a jejich invazivitě v rámci těchto malignit. *GDF10* využívá TGF β -Smad signální dráhu (Cheng et al., 2016; He et al., 2022; Zhou et al., 2019a).

V buněčné linii CRL-3240 byl v transfekovaných buňkách pozorován trend snížené exprese mRNA genů *JUN*, *FOS* a *KIF13A*. Poslední zmíněná mRNA vykazuje sníženou expresi i v buněčné linii SiHa. U buněčné linie FaDu nebyl pozorován trend zvýšené exprese mRNA žádného ze zmíněných genů v transfekovaných buňkách. Případná snížená či zvýšená exprese se rozchází s korespondující expresí v duplikátu a ani jeden směr změny exprese není podložen podobným trendem v proliferaci či migraci buněk. Podobných výsledků bylo dosaženo u mRNA genu *KIF13A* u buněčné linie C-33A, u které rovněž nebylo možné pozorovat trend snížení či zvýšení exprese. Změna exprese mRNA genu *JUN* v transfekovaných buňkách u linie SiHa nevykazovala žádný trend podobně jako u linie FaDu. Oproti tomu trend vzrůstu exprese mRNA genu *JUN* bylo možné pozorovat u buněčné linie C-33A. V téže buněčné linii (C-33A) je u transfekovaných buněk vidět zvýšení exprese mRNA genu *FOS*. Trend zvýšení exprese genu *FOS* byl pozorován i u buněčné linie SiHa, a to ještě ve vyšší míře. Trend zvýšení exprese mRNA genu *FOS* u buněčné linie SiHa by mohl vysvětlovat trend zvýšené migrace buněk téže linie.

Gen *FOS* hraje důležitou roli v rámci buněčné proliferace jako gen primární odpovědi (Q. Wang et al., 2017). Snížení exprese tohoto genu pomocí knock-down analýzy vedlo k inhibici proliferace i migrace buněčných linií (MG63) odvozených od osteosarkomu, ve kterých byla exprese genu *FOS* zvýšená oproti zdravým buňkám stejné lokalizace (Q. Wang et al.,

2017). Roli genu *FOS* v HNSCC studovali Muhammad a kol., kteří zjistili, že zvýšením jeho exprese vnesením plazmidu do HNSCC HPV⁻ buněk (Cal27) dochází ke zvýšení schopnosti buněk invadovat a migrovat. Roli *FOS* v nádorovém růstu pak dále studovali na imunokomprimovaných myších. Tyto myši byly injikovány nádorovými buňkami nesoucími plasmid s genem *FOS* i buňkami bez plazmidu. U buněk nesoucích plasmid byla u imunokomprimovaných myší pozorována vyšší míra růstu nádorů, než když do nich byly injikovány buňky neupravené. U myši s injikovanými buňkami nesoucími plasmid byla také pozorována zvýšená exprese markerů pro nádorové kmenové buňky (Nanog, c-Myc, Sox2, and Notch1) (Muhammad et al., 2017).

Zvýšení exprese genu *FOS* by tedy mělo mít dopad na zvýšení proliferace i migrace buněk, nicméně signifikantní změna v těchto schopnostech nebyla v této práci pozorována. V budoucnu by se měl provést cílený western blot, který by prověřil případné změny v expresi kandidátních genů v transfekovaných buněčných liniích oproti negativním kontrolám na proteinové úrovni. Studie sledující souvislost mezi hladinami exprese mRNA a proteinu ukázala, že odlišně exprimované mRNA korespondují lépe s jejich proteinovým produktem než nediferenciálně exprimované mRNA. V této studii byla detekována celkově nízká korespondence mezi expresí mRNA a proteinu, což přisuzují autoři post-transkripčním úrovním regulace (Koussounadis et al., 2015).

Transientní exprese mimikující a inhibující miRNA je často využívána jako nástroj pro funkční studie. Další možnost, která je rovněž v těchto studiích využívána, je vnesení miRNA za využití expresních vektorů na bázi lentivirů, retrovirů a plazmidů. Výhodou transientní exprese mimikujících/inhibujících miRNA v buňkách oproti expresním vektorům je snažší a rychlejší dosažení vyšších změn v expresi miRNA, kdy stačí pouze zvýšit množství miRNA vnášené do buněk. Expresní vektory produkují řádově nižší hladiny miRNA, ale na druhou stranu jsou exprese této miRNA a inhibice cílových mRNA déletrvající. Při využití virových expresních vektorů následuje vnášená sekvence miRNA stejnou dráhu biogeneze jako endogenní miRNA, nevýhodou je však možná indukce interferonů (Jin et al., 2015). Při využití transfekce mimikující miRNA do buněk by se rovněž mohlo porovnávat látkové množství transfekované miRNA s koncentrací studované miRNA v primárních buňkách, ve kterých je známo, že tyto miRNA fungují. Toto porovnání by mohlo pomoci při optimalizaci transfekce a mohlo by být provedeno buď pomocí RT-qPCR anebo pomocí northern blotu.

Pro miR-147b byla rovněž prostudována související literatura použitá pro vytvoření tabulky známých cílů této miRNA a pro navržení cílových genů. Ověření změn exprese

miR-147b po transfekci buněk miRNA inhibitorem a změn v proliferaci, migraci a expresi cílových genů budou provedeny v budoucích experimentech.

7 Závěr

MikroRNA miR-139-5p je v literatuře označována jako tumor supresivní a v HPV⁺ klinických nádorových vzorcích orofaryngu i hrdla děložního má sníženou expresi. Transfekce mimikující miR-139-5p do buněčných linií odvozených od karcinomou hypofaryngu a hrdla děložního měla za následek významné zvýšení její exprese v těchto liniích. Zvýšená exprese této miRNA nevedla ke statisticky signifikantním změnám v proliferaci a migraci u žádné buněčné linie. Pomocí databází TargetScan a miRDB byly predikovány cílové geny *FOS*, *JUN*, *KIF13A* a *GDF10*, přičež jejich mRNA byly ve studovaných buněčných liniích různě exprimované. Hladiny exprese některých mRNA v transfekovaných buněčných liniích zaznamenaly slabé snížení, zatímco hladiny jiných mRNA nezaznamenaly změny žádné. Zajímavé zjištění bylo zvýšení hladiny mRNA genu *FOS* u transfekovaných buněk buněčné linie SiHa.

8 Seznam použité literatury

* sekundární citace

Alarcón, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., & Tavazoie, S. F. (2015). N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, *519*(7544), 482–485.

Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., & Tuschl, T. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, *9*(3), 277–279.

Bao, B., Yu, X., & Zheng, W. (2022). MiR-139-5p targeting CCNB1 modulates proliferation, migration, invasion and cell cycle in lung adenocarcinoma. *Molecular Biotechnology*, *64*(8), 852–860.

* Bartel, D. P. (2018). Metazoan microRNAs. *Cell*, *173*(1), 20–51.

Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, *409*(6818), 363–366.

Blenkiron, C., Goldstein, L. D., Thorne, N. P., Spiteri, I., Chin, S. F., Dunning, M. J., Barbosa-Morais, N. L., Teschendorff, A. E., Green, A. R., Ellis, I. O., Tavaré, S., Caldas, C., & Miska, E. A. (2007). MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biology*, *8*(10), R214.

* Bonneau, E., Neveu, B., Kostantin, E., Tsongalis, G. J., & de Guire, V. (2019). How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market. *EJIFCC*, *30*(2), 114–127.

Božinović, K., Sabol, I., Dediol, E., Milutin Gašperov, N., Manojlović, S., Vojtechova, Z., Tachezy, R., & Grce, M. (2019). Genome-wide miRNA profiling reinforces the importance of miR-9 in human papillomavirus associated oral and oropharyngeal head and neck cancer. *Scientific Reports*, *9*(1), 2306.

Brown, J. R., Nigh, E., Lee, R. J., Ye, H., Thompson, M. A., Saudou, F., Pestell, R. G., & Greenberg, M. E. (1998). Fos family members induce cell cycle entry by activating cyclin D1. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(9), 5609–5619.

Centers for Disease Control and Prevention. *Cancers Associated with Human Papillomavirus, United States—2014–2018*. USCS Data Brief, no. 26. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services; 2021.

* Carlander, A. F., Jakobsen, K. K., Bendtsen, S. K., Gasset-Zamani, M., Lynggaard, C. D., Jensen, J. S., Grønhoj, C., & von Buchwald, C. (2021). A contemporary systematic review on repartition of HPV-positivity in oropharyngeal cancer worldwide. *Viruses*, *13*(7), 1326.

CDC. (n.d.). *Cancers Caused by HPV | Human Papillomavirus (HPV) | CDC*. Retrieved January 26, 2022, from <https://www.cdc.gov/hpv/parents/cancer.html>

Cerqueira, C., Samperio Ventayol, P., Vogeley, C., & Schelhaas, M. (2015). Kallikrein-8 proteolytically processes human papillomaviruses in the extracellular space to facilitate entry into host cells. *Journal of Virology*, *89*(14), 7038–7052.

Cheng, C. W., Hsiao, J. R., Fan, C. C., Lo, Y. K., Tzen, C. Y., Wu, L. W., Fang, W. Y., Cheng, A. J., Chen, C. H., Chang, I. S., Jiang, S. S., Chang, J. Y., & Lee, A. Y. L. (2016). Loss of GDF10/BMP3b as a prognostic marker collaborates with TGFBR3 to enhance chemotherapy resistance and epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*, *55*(5), 499–513.

Chi, Q., Wang, Z. Y., Li, H. Y., Song, D. bin, Xu, H., Ma, G., Wang, Z. M., & Li, X. M. (2019). Tumor-suppressor microRNA-139-5p restrains bladder cancer cell line ECV-304 properties via targeting Connexin 43. *Chinese Medical Journal*, *132*(19), 2354–2361.

- Chouhy, D., Bolatti, E. M., Pérez, G. R., & Giri, A. A. (2013). Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of putative human papillomavirus types. *Journal of General Virology*, 94(Pt 11), 2480–2488.
- Cui, S., Yang, X., Zhang, L., Zhao, Y., & Yan, W. (2018). LncRNA MAFG-AS1 promotes the progression of colorectal cancer by sponging miR-147b and activation of NDUFA4. *Biochemical and biophysical research communications*, 506(1), 251–258.
- Dalewska, N. (2021). Detekce a charakterizace makrofágů v nádorech virové a neviróvé etiologie. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Praha.
- * Daugaard, I., & Hansen, T. B. (2017). Biogenesis and function of Ago-associated RNAs. *Trends in Genetics: TIG*, 33(3), 208–219.
- *de Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T. R., Bernard, H. U., & zur Hausen, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324(1), 17–27.
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231–235.
- D'Souza, G., Wentz, A., Kluz, N., Zhang, Y., Sugar, E., Youngfellow, R. M., Guo, Y., Xiao, W., & Gillison, M. L. (2016). Sex differences in risk factors and natural history of oral human papillomavirus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 213(12), 1893–1896.
- Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K., & Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science (New York, N.Y.)*, 243(4893), 934–937.
- * Fabian, M. R., Sonenberg, N., & Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual review of biochemistry*, 79, 351–379.
- Fan, Q., He, M., Deng, X., Wu, W. K. K., Zhao, L., Tang, J., Wen, G., Sun, X., & Liu, Y. (2013). Derepression of c-Fos caused by microRNA-139 down-regulation contributes to the metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Cell biochemistry and function*, 31(4), 319–324.
- Fareh, M., Yeom, K. H., Haagsma, A. C., Chauhan, S., Heo, I., & Joo, C. (2016). TRBP ensures efficient Dicer processing of precursor microRNA in RNA-crowded environments. *Nature Communications*, 7(1), 13694.
- Feng, Y. Y., Liu, C. H., Xue, Y., Chen, Y. Y., Wang, Y. L., & Wu, X. Z. (2020). MicroRNA-147b promotes lung adenocarcinoma cell aggressiveness through negatively regulating microfibril-associated glycoprotein 4 (MFAP4) and affects prognosis of lung adenocarcinoma patients. *Gene*, 730, 144316.
- * Filipów, S., & Łaczmanski, Ł. (2019). Blood circulating miRNAs as cancer biomarkers for diagnosis and surgical treatment response. *Frontiers in genetics*, 10, 169.
- Ge, P., Cao, L., Chen, X., Jing, R., & Yue, W. (2019). miR-762 activation confers acquired resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*, 19(1), 1203.
- * Ghosh, P., Dahms, N. M., & Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nature Reviews. Molecular cell biology*, 4(3), 202–212.
- Giarrè, M., Caldeira, S., Malanchi, I., Ciccolini, F., Leão, M. J., & Tommasino, M. (2001). Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *Journal of Virology*, 75(10), 4705–4712.
- * Graham, S. v. (2010). Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. *Future microbiology*, 5(10), 1493–1506.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., & Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), D140–D144.

- Han, M. S., Lee, J. M., Kim, S. N., Kim, J. H., & Kim, H. S. (2018). Human papillomavirus 16 oncoproteins downregulate the expression of miR-148a-3p, miR-190a-5p, and miR-199b-5p in cervical cancer. *BioMed research international*, 2018, 1942867.
- * Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46.
- * Hashim, D., Genden, E., Posner, M., Hashibe, M., & Boffetta, P. (2019). Head and neck cancer prevention: from primary prevention to impact of clinicians on reducing burden. *Annals of oncology*, 30(5), 744–756.
- He, F., Feng, G., Ma, N., Midorikawa, K., Oikawa, S., Kobayashi, H., Zhang, Z., Huang, G., Takeuchi, K., & Murata, M. (2022). GDF10 inhibits cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma by the transforming growth factor- β /Smad and NF- κ B pathways. *Carcinogenesis*, 43(2), 94–103.
- Hou, J., Zhuo, H., Chen, X., Cheng, J., Zheng, W., Zhong, M., & Cai, J. C. (2020). MiR-139-5p negatively regulates PMP22 to repress cell proliferation by targeting the NF- κ B signaling pathway in gastric cancer. *International journal of biological sciences*, 16(7), 1218–1229.
- HPV-Associated Cancer Statistics | CDC. (n.d.). Retrieved January 28, 2022, from <https://www.cdc.gov/cancer/hpv/statistics/index.htm>
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., & Zimmermann, P. (2008). Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in bioinformatics*, 2008, 420747.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., & Howley, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *The EMBO journal*, 10(13), 4129–4135.
- Ji, X., Guo, H., Yin, S., & Du, H. (2019b). MiR-139-5p functions as a tumor suppressor in cervical cancer by targeting TCF4 and inhibiting Wnt/ β -catenin signalling. *OncoTargets and therapy*, 12, 7739–7748.
- Jia, Y., Ding, X., Zhou, L., Zhang, L., & Yang, X. (2021). Mesenchymal stem cells-derived exosomal microRNA-139-5p restrains tumorigenesis in bladder cancer by targeting PRC1. *Oncogene*, 40(2), 246–261.
- Jiao, W., Zhang, J., Wei, Y., Feng, J., Ma, M., Zhao, H., Wang, L., & Jiao, W. (2019). MiR-139-5p regulates VEGFR and downstream signaling pathways to inhibit the development of esophageal cancer. *Digestive and liver disease*, 51(1), 149–156.
- Jin, H. Y., Gonzalez-Martin, A., Miletic, A. v., Lai, M., Knight, S., Sabouri-Ghomi, M., Head, S. R., Macauley, M. S., Rickert, R. C., & Xiao, C. (2015). Transfection of microRNA mimics should be used with caution. *Frontiers in genetics*, 6, 340.
- * Kajitani, N., Satsuka, A., Kawate, A., & Sakai, H. (2012). Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Frontiers in microbiology*, 3, 152.
- Kamal, M., Lameiras, S., Deloger, M., Morel, A., Vacher, S., Lecerf, C., Dupain, C., Jeannot, E., Girard, E., Baulande, S., Dubot, C., Kenter, G., Jordanova, E. S., Berns, E. M. J. J., Bataillon, G., Popovic, M., Rouzier, R., Cacheux, W., le Tourneau, C., Nicolas, A., ... RAIDs Consortium. (2021). Human papilloma virus (HPV) integration signature in Cervical Cancer: identification of MACROD2 gene as HPV hot spot integration site. *British journal of cancer*, 124(4), 777–785.
- Kämper, N., Day, P. M., Nowak, T., Selinka, H.-C., Florin, L., Bolscher, J., Hilbig, L., Schiller, J. T., & Sapp, M. (2006). A membrane-destabilizing peptide in capsid protein L2 is required for egress of papillomavirus genomes from endosomes. *Journal of virology*, 80(2), 759–768.
- karcinogeneze » Linkos.cz. (n.d.). Retrieved June 8, 2022, from <https://www.linkos.cz/slovnicek/kancerogeneze-kancerogeny/>
- * Keiffer, T. R., Soorya, S., & Sapp, M. J. (2021). Recent advances in our understanding of the infectious entry pathway of human papillomavirus type 16. *Microorganisms*, 9(10), 2076.

- Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, *115*(2), 209–216.
- Kim, Y. K., & Kim, V. N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *The EMBO journal*, *26*(3), 775–783.
- Kines, R. C., Thompson, C. D., Lowy, D. R., Schiller, J. T., & Day, P. M. (2009). The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(48), 20458–20463.
- Kleemann, M., Bereuther, J., Fischer, S., Marquart, K., Hänle, S., Unger, K., Jendrossek, V., Riedel, C. U., Handrick, R., & Otte, K. (2017). Investigation on tissue specific effects of pro-apoptotic micro RNAs revealed miR-147b as a potential biomarker in ovarian cancer prognosis. *Oncotarget*, *8*(12), 18773–18791.
- Koslabova, E., Hamsikova, E., Salakova, M., Klozar, J., Foltynova, E., Salkova, E., Rotnaglova, E., Ludvikova, V., & Tachezy, R. (2013). Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors. *International journal of cancer*, *133*(8), 1832–1839.
- Koussounadis, A., Langdon, S. P., Um, I. H., Harrison, D. J., & Smith, V. A. (2015). Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. *Scientific reports*, *5*, 10775.
- Kovářiková, P., Michalová, E., Knopfová, L., & Bouchal, P. (2014). Metody studia buněčné migrace a invazivity nádorových buněk. *Klinická onkologie*, *27 Suppl 1*, S22–S27.
- * Kumar, S., & Reddy, P. H. (2016). Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease? *Biochimica et biophysica acta*, *1862*(9), 1617–1627.
- * Kunej, T., Godnic, I., Horvat, S., Zorc, M., & Calin, G. A. (2012). Cross talk between microRNA and coding cancer genes. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, *18*(3), 223–231.
- Kuo, S. R., Liu, J. S., Broker, T. R., & Chow, L. T. (1994). Cell-free replication of the human papillomavirus DNA with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts. *Journal of biological chemistry*, *269*(39), 24058–24065.
- Lajer, C. B., Garnæs, E., Friis-Hansen, L., Norrild, B., Therkildsen, M. H., Glud, M., Rossing, M., Lajer, H., Svane, D., Skotte, L., Specht, L., Buchwald, C., & Nielsen, F. C. (2012). The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer. *British journal of cancer*, *106*(9), 1526–1534.
- * Lechner, M., Liu, J., Masterson, L., & Fenton, T. R. (2022). HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management. *Nature reviews. Clinical oncology*, *19*(5), 306–327.
- Lee, C. G., McCarthy, S., Gruidl, M., Timme, C., & Yeatman, T. J. (2014). MicroRNA-147 induces a mesenchymal-to-epithelial transition (MET) and reverses EGFR inhibitor resistance. *PLoS one*, *9*(1), e84597.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambrost, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843–854.
- Lee, S. B., Park, Y. S., Sung, J. S., Lee, J. W., Kim, B., & Kim, Y. H. (2021). Tumor suppressor miR-584-5p inhibits migration and invasion in smoking related non-small cell lung cancer cells by targeting YKT6. *Cancers*, *13*(5), 1159.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, *23*(20), 4051–4060.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, *120*(1), 15–20.
- Li, F., Wang, X., & Yang, L. (2020). MicroRNA-147 targets BDNF to inhibit cell proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer. *Oncology letters*, *20*(2), 1931–1937.

- Li, J., Li, Q., Lin, L., Wang, R., Chen, L., Du, W., Jiang, C., & Li, R. (2018). Targeting the Notch1 oncogene by miR-139-5p inhibits glioma metastasis and epithelial-mesenchymal transition (EMT). *BMC neurology*, *18*(1), 133.
- Li, P., Xiao, Z., Luo, J., Zhang, Y., & Lin, L. (2019). MiR-139-5p, miR-940 and miR-193a-5p inhibit the growth of hepatocellular carcinoma by targeting SPOCK1. *Journal of cellular and molecular medicine*, *23*(4), 2475–2488.
- Li, Q., Liang, X., Wang, Y., Meng, X., Xu, Y., Cai, S., Wang, Z., Liu, J., & Cai, G. (2016). miR-139-5p inhibits the epithelial-mesenchymal transition and enhances the chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by downregulating BCL2. *Scientific reports*, *6*, 27157.
- Li, R. Y., Chen, L. C., Zhang, H. Y., Du, W. Z., Feng, Y., Wang, H. B., Wen, J. Q., Liu, X., Li, X. F., Sun, Y., Yang, D. B., Jiang, T., Li, Y. L., & Jiang, C. L. (2013). MiR-139 inhibits Mcl-1 expression and potentiates TMZ-induced apoptosis in glioma. *CNS neuroscience & therapeutics*, *19*(7), 477–483.
- Li, X., & Coffino, P. (1996). High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *Journal of virology*, *70*(7), 4509–4516.
- Li, Y., Sun, Y., Li, Z., Li, S., & Wu, C. (2022). MiR-139-5p inhibits the development of gastric cancer through targeting TPD52. *Journal of healthcare engineering*, *2022*, 4033373.
- Liu, J., Li, C., Jiang, Y., Wan, Y., Zhou, S., & Cheng, W. (2018). Tumor-suppressor role of miR-139-5p in endometrial cancer. *Cancer cell international*, *18*, 51.
- Liu, R., Yang, M., Meng, Y., Liao, J., Sheng, J., Pu, Y., Yin, L., & Kim, S. J. (2013). Tumor-suppressive function of miR-139-5p in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS one*, *8*(10), e77068.
- * Ljubojevic, S., & Skerlev, M. (2014). HPV-associated diseases. *Clinics in dermatology*, *32*(2), 227–234.
- Longworth, M. S., Wilson, R., & Laimins, L. A. (2005). HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *The EMBO journal*, *24*(10), 1821–1830.
- Lu, W., Feng, L., Li, P., Wang, Y., Du, Y., Chen, X., Wu, S., Zhao, G., & Lou, W. (2016). Effects of HPV-16 infection on hypopharyngeal squamous cell carcinoma and FaDu cells. *Oncology reports*, *35*(1), 99–106.
- Ma, J., Zhang, J., Weng, Y. C., & Wang, J. C. (2018). EZH2-mediated microRNA-139-5p regulates epithelial-mesenchymal transition and lymph node metastasis of pancreatic cancer. *Molecules and cells*, *41*(9), 868–880.
- * Mac, M., & Moody, C. A. (2020). Epigenetic regulation of the human papillomavirus life cycle. *Pathogens*, *9*(6), 483.
- Mason, D., Zhang, X., Marques, T. M., Rose, B., Khoury, S., Hill, M., Deutsch, F., Lyons, J. G., Gama-Carvalho, M., & Tran, N. (2018). Human papillomavirus 16 E6 modulates the expression of miR-496 in oropharyngeal cancer. *Virology*, *521*, 149–157.
- * McBride, A. A. (2013). The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, *445*(1-2), 57–79.
- Mkrtchian, L., Zamulaeva, I., Krikunova, L., Kiseleva, V., Matchuk, O., Liubina, L., Kulieva, G., Ivanov, S., & Kaprin, A. (2021). HPV status and individual characteristics of human papillomavirus infection as predictors for clinical outcome of locally advanced cervical cancer. *Journal of personalized medicine*, *11*(6), 479.
- * Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature reviews. cancer*, *10*(8), 550–560.
- Morgan, E. L., Patterson, M. R., Ryder, E. L., Lee, S. Y., Wasson, C. W., Harper, K. L., Li, Y., Griffin, S., Blair, G. E., Whitehouse, A., & Macdonald, A. (2020). MicroRNA-18a targeting of the STK4/MST1 tumour suppressor is necessary for transformation in HPV positive cervical cancer. *PLoS pathogens*, *16*(6), e1008624.

- MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation*. (n.d.). Retrieved June 27, 2022, from <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>
- Muhammad, N., Bhattacharya, S., Steele, R., Phillips, N., & Ray, R. B. (2017). Involvement of c-Fos in the promotion of cancer stem-like cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research: An official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(12), 3120–3128.
- Müller, K. H., Spoden, G. A., Scheffer, K. D., Brunnhöfer, R., de Brabander, J. K., Maier, M. E., Florin, L., & Muller, C. P. (2014). Inhibition by cellular vacuolar atpase impairs human papillomavirus uncoating and infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(5), 2905–2911.
- Münger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E., & Howley, P. M. (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *The EMBO journal*, 8(13), 4099–4105.
- Muñoz, N., Bosch, F. X., de Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. v., Snijders, P. J. F., & Meijer, C. J. L. M. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *The New England journal of medicine*, 348(6), 518–527.
- Nakagawa, T., Setou, M., Seog, D. H., Ogasawara, K., Dohmae, N., Takio, K., & Hirokawa, N. (2000). A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell*, 103(4), 569–581.
- Nam, R. K., Benatar, T., Wallis, C. J. D., Kobylecky, E., Amemiya, Y., Sherman, C., & Seth, A. (2019). MicroRNA-139 is a predictor of prostate cancer recurrence and inhibits growth and migration of prostate cancer cells through cell cycle arrest and targeting IGF1R and AXL. *The Prostate*, 79(12), 1422–1438.
- Ning, Q., Pang, Y., Shao, S., Luo, M., Zhao, L., Hu, T., & Zhao, X. (2020). MicroRNA-147b suppresses the proliferation and invasion of non-small-cell lung cancer cells through downregulation of Wnt/ β -catenin signalling via targeting of RPS15A. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 47(3), 449–458.
- Nunvar, J., Pagacova, L., Vojtechova, Z., de Azevedo, N. T. D., Smahelova, J., Salakova, M., & Tachezy, R. (2021). Lack of conserved miRNA deregulation in hpv-induced squamous cell carcinomas. *Biomolecules*, 11(5), 764.
- O’Sullivan, B., Huang, S. H., Su, J., Garden, A. S., Sturgis, E. M., Dahlstrom, K., Lee, N., Riaz, N., Pei, X., Koyfman, S. A., Adelstein, D., Burkey, B. B., Friberg, J., Kristensen, C. A., Gothelf, A. B., Hoebbers, F., Kremer, B., Speel, E.-J., Bowles, D. W., Raben, D., ... Xu, W. (2016). Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *The Lancet. Oncology*, 17(4), 440–451.
- Pagáčová, L. (2020). Analýza miRNA u nádorů asociovaných s lidskými papilomaviry. *Diplomová Práce*. Univerzita Karlova, Praha.
- * Peng, B., Theng, P. Y., & Le, M. T. N. (2021). Essential functions of miR-125b in cancer. *Cell proliferation*, 54(2), e12913.
- * Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 1, 15004.
- Porkka, K. P., Pfeiffer, M. J., Waltering, K. K., Vessella, R. L., Tammela, T. L. J., & Visakorpi, T. (2007). MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer research*, 67(13), 6130–6135.
- Qu, F., Zheng, J., Gan, W., Lian, H., He, H., Li, W., Yuan, T., Yang, Y., Li, X., Ji, C., Yan, X., Xu, L., & Guo, H. (2017). MiR-199a-3p suppresses proliferation and invasion of prostate cancer cells by targeting Smad1. *Oncotarget*, 8(32), 52465–52473.

- Rotnáglóvá, E., Tachezy, R., Saláková, M., Procházka, B., Košl' Abová, E., Veselá, E., Ludvíková, V., Hamšíková, E., & Klozar, J. (2011). HPV involvement in tonsillar cancer: prognostic significance and clinically relevant markers. *International journal of cancer*, *129*(1), 101–110.
- Sagona, A. P., Nezis, I. P., Pedersen, N. M., Liestøl, K., Poulton, J., Rusten, T. E., Skotheim, R. I., Raiborg, C., & Stenmark, H. (2010). PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nature cell biology*, *12*(4), 362–371.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., & Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, *63*(6), 1129–1136.
- Schwarz, D. S., Hutvágner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., & Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, *115*(2), 199–208.
- * Shaulian, E., & Karin, M. (2001). AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene*, *20*(19), 2390–2400.
- Shen, Y., Schmidt, B. U. S., Kubitschke, H., Morawetz, E. W., Wolf, B., Käs, J. A., & Losert, W. (2020). Detecting heterogeneity in and between breast cancer cell lines. *Cancer convergence*, *4*(1), 1.
- Shi, Y. K., & Guo, Y. H. (2018). MiR-139-5p suppresses osteosarcoma cell growth and invasion through regulating DNMT1. *Biochemical and biophysical research communications*, *503*(2), 459–466.
- * Singh, S., Narang, A. S., & Mahato, R. I. (2011). Subcellular fate and off-target effects of siRNA, shRNA, and miRNA. *Pharmaceutical research*, *28*(12), 2996–3015.
- Song, M., Yin, Y., Zhang, J., Zhang, B., Bian, Z., Quan, C., Zhou, L., Hu, Y., Wang, Q., Ni, S., Fei, B., Wang, W., Du, X., Hua, D., & Huang, Z. (2014). MiR-139-5p inhibits migration and invasion of colorectal cancer by downregulating AMFR and NOTCH1. *Protein & cell*, *5*(11), 851–861.
- Sonoki, T., Iwanaga, E., Mitsuya, H., & Asou, N. (2005). Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, *19*(11), 2009–2010.
- Sun, C., Sang, M., Li, S., Sun, X., Yang, C., Xi, Y., Wang, L., Zhang, F., Bi, Y., Fu, Y., & Li, D. (2015). Hsa-miR-139-5p inhibits proliferation and causes apoptosis associated with down-regulation of c-Met. *Oncotarget*, *6*(37), 39756–39792.
- Thomas, M. C., & Chiang, C. M. (2005). E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. *Molecular cell*, *17*(2), 251–264.
- Tomaszewska, W., Kozłowska-Masłoń, J., Baranowski, D., Perkowska, A., Szalkowska, S., Kazimierczak, U., Severino, P., Lamperska, K., & Kolenda, T. (2021). miR-154 influences HNSCC development and progression through regulation of the epithelial-to-mesenchymal transition process and could be used as a potential biomarker. *Biomedicines*, *9*(12), 1894.
- Uhlorn, B. L., Jackson, R., Li, S., Bratton, S. M., van Doorslaer, K., & Campos, S. K. (2020). Vesicular trafficking permits evasion of cGAS/STING surveillance during initial human papillomavirus infection. *PLoS pathogens*, *16*(11), e1009028.
- Viens, L. J., Henley, S. J., Watson, M., Markowitz, L. E., Thomas, C. C., Thompson, T. D., Razzaghi, H., & Saraiya, M. (2019). Human Papillomavirus–Associated Cancers — United States, 2008–2012. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *65*(26), 661–666.
- * Vogt Sionov, R., & Haupt, Y. (1999). The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*, *18*(45), 6145–6157.
- Vojtechova, Z., Sabol, I., Salakova, M., Smahelova, J., Zavadil, J., Turek, L., Grega, M., Klozar, J., Prochazka, B., & Tachezy, R. (2016). Comparison of the miRNA profiles in HPV-positive and HPV-negative tonsillar tumors and a model system of human keratinocyte clones. *BMC cancer*, *16*, 382.

- Vojtechova, Z., Zavadil, J., Klozar, J., Grega, M., & Tachezy, R. (2017). Comparison of the miRNA expression profiles in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tonsillar tumors. *PLoS one*, *12*(6), e0179645.
- Wang, K., Jin, J., Ma, T., & Zhai, H. (2017). MiR-139-5p inhibits the tumorigenesis and progression of oral squamous carcinoma cells by targeting HOXA9. *Journal of cellular and molecular medicine*, *21*(12), 3730–3740.
- Wang, L., Liu, Y., Yu, Z., Gong, J., Deng, Z., Ren, N., Zhong, Z., Cai, H., Tang, Z., Cheng, H., Chen, S., & He, Z. (2021). Mir-139-5p inhibits glioma cell proliferation and progression by targeting GABRA1. *Journal of translational medicine*, *19*(1), 213.
- Wang, Q., Liu, H., Wang, Q., Zhou, F., Liu, Y., Zhang, Y., Ding, H., Yuan, M., Li, F., & Chen, Y. (2017). Involvement of c-Fos in cell proliferation, migration, and invasion in osteosarcoma cells accompanied by altered expression of Wnt2 and Fzd9. *PLOS one*, *12*(6), e0180558.
- Wang, Q., Xu, B., Du, J., Xu, X., Shang, C., Wang, X., & Wang, J. (2018). MicroRNA-139-5p/Flt1/Wnt/β-catenin regulatory crosstalk modulates the progression of glioma. *International journal of molecular medicine*, *41*(4), 2139–2149.
- Wang, X., & el Naqa, I. M. (2008). Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics*, *24*(3), 325–332.
- Wang, Y., Li, J., Xu, C., & Zhang, X. (2018). MicroRNA-139-5p inhibits cell proliferation and invasion by targeting RHO-associated coiled-coil-containing protein kinase 2 in ovarian cancer. *Oncology research*, *26*(3), 411–420.
- WHO. (n.d.). *Cervical cancer*. Retrieved January 26, 2022, from [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)
- Wong, C. C., Wong, C., Tung, E. K., Au, S. L., Lee, J. M., Poon, R. T., Man, K., & Ng, I. O. (2011). The MicroRNA miR-139 suppresses metastasis and progression of hepatocellular carcinoma by down-regulating Rho-kinase 2. *Gastroenterology*, *140*(1), 322–331.
- Wu, J., Zhang, T., Chen, Y., & Ha, S. (2020). MiR-139-5p influences hepatocellular carcinoma cell invasion and proliferation capacities via decreasing SLITRK4 expression. *Bioscience reports*, *40*(5), BSR20193295.
- Wu, Y., Li, H., Xie, J., Wang, F., Cao, D., & Lou, Y. (2020). MiR-139-5p affects cell proliferation, migration and adipogenesis by targeting insulin-like growth factor 1 receptor in hemangioma stem cells. *International journal of molecular medicine*, *45*(2), 569–577.
- Xia, Y. F., Pei, G. H., Wang, N., Che, Y. C., Yu, F. S., Yin, F. F., Liu, H. X., Luo, B., & Wang, Y. K. (2017). miR-3156-3p is downregulated in HPV-positive cervical cancer and performs as a tumor-suppressive miRNA. *Virology journal*, *14*(1), 20.
- Xu, W., Hang, M., Yuan, C. Y., Wu, F. L., Chen, S. B., & Xue, K. (2015). MicroRNA-139-5p inhibits cell proliferation and invasion by targeting insulin-like growth factor 1 receptor in human non-small cell lung cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, *8*(4), 3864–3870.
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R. M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., Calin, G. A., Liu, C. G., Croce, C. M., & Harris, C. C. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer cell*, *9*(3), 189–198.
- Yang, L., Mohr, I., Fouts, E., Lim, D. A., Nohaile, M., & Botchan, M. (1993). The E1 protein of bovine papilloma virus 1 is an ATP-dependent DNA helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(11), 5086–5090.
- Yi, L., Zhong, X., Chen, Z., Wang, Q., Yan, Y., Wang, J., & Deng, X. (2019). MicroRNA-147b promotes proliferation and invasion of human colorectal cancer by targeting RAS oncogene family (RAP2B). *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, *86*(4), 173–181.

- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*, *17*(24), 3011–3016.
- Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., & Tomari, Y. (2009). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nature structural & molecular biology*, *17*(1), 17–23.
- Yonemori, M., Seki, N., Yoshino, H., Matsushita, R., Miyamoto, K., Nakagawa, M., & Enokida, H. (2016). Dual tumor-suppressors miR-139-5p and miR-139-3p targeting matrix metalloprotease 11 in bladder cancer. *Cancer science*, *107*(9), 1233–1242.
- Zang, B., Huang, G., Wang, X., & Zheng, S. (2015). HPV-16 E6 promotes cell growth of esophageal cancer via downregulation of miR-125b and activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *International journal of clinical and experimental pathology*, *8*(10), 13687–13694.
- Zhang, E., Liu, Q., Wang, Y., Wang, H., He, L., Jin, X., Li, N., Zhang, E., Liu, Q., Wang, Y., Wang, H., He, L., Jin, X., & Li, N. (2017). MicroRNA miR-147b promotes tumor growth via targeting UBE2N in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, *8*(69), 114072–114080.
- Zhang, L., Dong, Y., Zhu, N., Tsoi, H., Zhao, Z., Wu, C. W., Wang, K., Zheng, S., Ng, S. S. M., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Yu, J. (2014). MicroRNA-139-5p exerts tumor suppressor function by targeting NOTCH1 in colorectal cancer. *Molecular cancer*, *13*, 124.
- Zhang, Y., Li, M., Qiu, Y., Wu, Y., Chen, S., bin Ni, ., Tang, D., Deng, Z., & Hu, Z. (2022). MiR-139-5p/ENAH affects progression of hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical genetics*, 10.1007/s10528-022-10204-9.
- Zhang, Y., Zhang, H., & Liu, Z. (2016). MicroRNA-147 suppresses proliferation, invasion and migration through the AKT/mTOR signaling pathway in breast cancer. *Oncology letters*, *11*(1), 405–410.
- Zhang, Z., Li, W., Jiang, D., Liu, C., & Lai, Z. (2020). MicroRNA-139-5p inhibits cell viability, migration and invasion and suppresses tumor growth by targeting HDGF in non-small cell lung cancer. *Oncology letters*, *19*(3), 1806–1814.
- Zhou, T., Yu, L., Huang, J., Zhao, X., Li, Y., Hu, Y., & Lei, Y. (2019a). GDF10 inhibits proliferation and epithelial-mesenchymal transition in triple-negative breast cancer via upregulation of Smad7. *Aging*, *11*(10), 3298–3314.
- Zhou, H., Zhang, L., & Tu, H. (2019b). Downregulation of thymopoietin by miR-139-5p suppresses cell proliferation and induces cell cycle arrest/apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncology letters*, *18*(4), 3443–3452.
- zur Hausen, H. (1976). Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer research*, *36*(2 Part 2), 794.

9 Přílohy

Příloha 1: Přehledová tabulka zobrazující role a známé cíle 21 vybraných miRNA v rámci různých malignit.